UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY
MAR 28 '56

EXPERIENTIA

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
P. HUBER · R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA
Basel Lausanne Bern Zürich
Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL
SUISSE – SCHWEIZ – SVIZZERA – SWITZERLAND

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

G. WITTIG: Synthesen über Stickstoff-ylide und Phosphor-ylene 41

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

A. MANGINI and R. PASSERINI: Can the Sulphur-Bridge be Considered as a Relay of Conjugation? 49
E. VISCHER, J. SCHMIDLIN und A. WETTSTEIN: Mikrobiologische Spaltung razemischer Steroide. Synthese von *d*-Aldosteron 50
S. G. SMITH: Extreme Chromosomal Polymorphism in a Coccinellid Beetle 52
R. MATTHEY et J. M. VAN BRINK: La question des hétérochromosomes chez les Sauropsidés. I. Reptiles. 53
G. REVERBERI: The Mitochondrial Pattern in the Development of the Ascidian Egg 55
W. BOLLAG: Nachweis von individualspezifischen Gewebsantikörpern 57
M. M. LALORAYA, GOVINDJEE, RAJNI VARMA, and T. RAJARAO: Increased Formation of Asparagine in "Caricacurl" Virus Infected Leaves 58
VERA BAJIC, L. ROBERT et J. POLONOVSKI: Sur l'interaction entre aldéhydes ou réductones et acides aminés ou protéines 59
R. MEIER, P. A. DESAULLES und P. LOUSTALOT: Wirkung eines tumorhemmenden Stoffes, des Triäthylenmelamins, auf das Wachstum von Fremdkörpergranulom und Tumor. 61
V. ERSPAMER: Observations on the 5-Hydroxytryptamine (Enteramine) Release Caused by Reserpine in the Rat . . 63
S. R. DASGUPTA and H. F. HÄUSLER: Respiratory Changes in Decorticate Cats Following Transverse Sections Through the Hypothalamus 64
J. GILLMAN and CHRISTINE GILBERT: The Participation of the Adrenal and Thyroid in Fat Metabolism in Hypophysectomized Baboons (*Papio ursinus*) 65
D. J. SILIDES and J. MAYER: Effect of Hormonal and Dietary Treatments on Lipogenesis from Acetate in Hereditarily Obese Hyperglycemic Mice 66
G. KUSCHINSKY, H. LÜLLMANN, W. HOEFKE und E. MUSCHOLL: Über den Zusammenhang zwischen histologischer Struktur und funktionellem Verhalten des Skelettmuskels. 68
E. ZEBE: Die α-Glycerophosphat-Oxydation des Heuschreckenbrustmuskels (*Locusta migratoria*) 68
J. CHURY: Modifikation der histologischen und hämatologischen Veränderungen bei Ratten nach Gaben von Trichlortriäthylamin-Hydrochlorid-Lösungen durch Äthernarkose 70
Z. SUPEK and S. MILKOVIĆ: Quantitative Biological Determination of 5-Hydroxytryptamine 71
M. POLSTER: On the Mode of Action of Synthetic Antituberculotica 72
N. P. BUU-HOÏ, A. BOUFFANAIS, P. GLEY, N. D. XUONG et N. H. NAM: Activité *in vivo* de dérivés de la thiourée contre le virus de l'influenza. 73
W. H. DUDOK VAN HEEL: Pitch Discrimination in the Minnow (*Phoxinus laevis*) at Different Temperature Levels . 75
B. PRIJS und H. ERLENMEYER: Papierchromatographische Ultramikro-Alkalimetrie (Pro Experimentis) 77

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

Studiorum progressus: J. E. ROMBOUTS and J. LINKS: The Chemical Nature of the Antibacterial Substance Present in *Aucuba japonica* Thunbg. 78

EXPERIENTIA

L'EXPERIENTIA publiera:

1. des *articles originaux* sur les récentes recherches scientifiques écrits dans une des langues principales;
2. de *brèves communications;*
3. informera ses lecteurs des événements marquants de la vie scientifique, donnera des *comptes rendus concernant les récentes publications, les congrès et les assemblées.*

Die EXPERIENTIA stellt sich die Aufgabe:

1. durch *zusammenfassende Originalartikel* in einer der wissenschaftlichen Hauptsprachen von Autoren aus verschiedenen Ländern über Forschungsergebnisse berichten zu lassen, die im Vordergrund des Interesses stehen;
2. kurze *Mitteilungen* aufzunehmen;
3. durch Besprechung neuerschienener *Bücher*, durch Referate über *Kongresse* und *Versammlungen* sowie durch andere Mitteilungen über die bedeutendsten Ereignisse des naturwissenschaftlichen Lebens zu informieren.

EXPERIENTIA si propone di pubblicare:

1. *articoli originali riassuntivi*, in una delle principali lingue usate dalla scienza, ad opera di autori di diversi paesi, su risultati scientifici di grande interesse;
2. *brevi comunicazioni;*
3. *recensioni di nuovi libri, relazioni di congressi e riunioni*, come pure altre comunicazioni su importanti avvenimenti nel campo delle scienze naturali.

The aim of EXPERIENTIA is:

1. to publish comprehensive articles embodying the results of recent scientific research. These will be written in one of the principal scientific languages and contributed by authors in various countries;
2. to publish *brief reports;*
3. to give information about the most important events in natural science by means of *reviews of the latest books, reports on congresses and meetings*, as well as through other communications.

EXPER.

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an Fr. 36.– pour la Suisse; pour l'étranger fr. 46.–. Ces prix s'entendent en francs suisses.
Adresser toute correspondance touchant la rédaction de l'EXPERIENTIA exclusivement à l'éditeur soussigné.
Dernier délai d'admission pour les manuscrits: 2 mois avant la parution. Les auteurs recevront gratuitement, s'ils le désirent, 50 tirés à part de format 14,5 sur 21 cm, sans couverture. Pour le prix d'un nombre plus grand et pour la couverture s'adresser à l'éditeur. Les tirages à part doivent être commandés *avant* l'impression du périodique.
Prix pour les annonces: $^1/_1$ page fr. 220.–, ½ page fr. 132.–, ¼ page fr. 77.–. Placements spéciaux: prix sur demande. Demandes à l'éditeur.
L'EXPERIENTIA est imprimée en Suisse.

Editions Birkhäuser S.A., Bâle 10 (Suisse), Elisabethenstrasse 15
Tél. 249800; adresse télégraphique: Edita Bâle

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 36.– per la Svizzera; all'estero fr. 46.–. I prezzi vanno intesi valuta svizzera.
Tutti gli invii alla redazione di EXPERIENTIA vanno indirizzati esclusivamente alla sottoindicata casa editrice.
La redazione di ogni fascicolo si chiude 2 mesi prima della pubblicazione.
Gli autori ricevono, su desiderio, 50 estratti del formato 14,5 ×21 cm, senza copertina. Il prezzo degli estratti in più e della copertina viene indicato, su richiesta, dalla casa editrice. Gli estratti vanno ordinati *prima* della stampa della Rivista.
Prezzi per annunci: $^1/_1$ pag. fr. 220.–, ½ pag. fr. 132.–, ¼ pag. fr. 77.–; per pagine speciali, accordi da stabilire. Gli annunci sono da inviare alla casa editrice.
EXPERIENTIA si stampa in Isvizzera.

Casa editrice Birkhäuser S.A., Basilea 10 (Svizzera), Elisabethenstr. 15
Tel. 249800; Indirizzo telegrammi: Edita Basilea

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Auslande durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. In Algerien, Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Italien, Luxemburg, Marokko, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden nehmen auch die Postämter Bestellungen entgegen. Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 36.–, im Ausland sFr. 46.–.
Alle Zuschriften an die Redaktion sind ausschliesslich an den Verlag zu richten. Redaktionsschluss 2 Monate vor Erscheinungsdatum.
Die Autoren erhalten auf Wunsch 50 Gratisseparata im Format 14,5 ×21 cm, ohne Umschlag. Die Kosten für weitere Separata und für Umschläge sind beim Verlag zu erfragen. Separata sind *vor* dem Druck der Zeitschrift zu bestellen.
Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, ½ Seite Fr. 132.–, ¼ Seite Fr. 77.–; für Vorzugsseiten besondere Vereinbarung. Inseratenannahme durch den Verlag.
Die EXPERIENTIA wird in der Schweiz gedruckt.

Birkhäuser Verlag AG., Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstrasse 15
Tel. 249800; Telegrammadresse: Edita Basel

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The annual subscription price by inland mail is fr. 36.–; other countries fr. 46.–. Prices in Swiss currency. All communications to the editors should be addressed to the publishers. All manuscripts for publication in a given number must be in the hands of the publishers 2 months before the publication.
The authors receive, on request, 50 reprints 14,5 ×21 cm without cover free of charge. For the prices of additional reprints and covers, inquiries should be addressed to the publishers. Reprints must be ordered *before* the number is printed.
Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, ½ page fr. 132.–, ¼ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.

Published by Birkhäuser Ltd., Basle 10 (Switzerland), Elisabethenstr. 15
Phone 249800; Telegrams: Edita Basle

Printed in Switzerland / Birkhäuser AG. Basel

Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia XII/2

Birkhäuser Verlag, Basel
Ciba AG., Basel
Eidg. Techn. Hochschule, Zürich
Ganz & Co., Zürich
Sandoz AG., Basel
Verlag Chemie GmbH., Weinheim

NEUERSCHEINUNG

EXPERIENTIA SUPPLEMENTUM III

Acta XI Congressus Internationalis Ornithologici

BASEL, 29. MAI – 5. JUNI 1954

Im Auftrage des Präsidenten
Sir LANDSBOROUGH THOMSON
herausgegeben von
ADOLF PORTMANN und ERNST SUTTER

Mit 186 Abbildungen
und 14 Tafeln im Kupfertiefdruck
Relié en toile – Full cloth – Ganzleinen
680 pp. (1955) Fr. 36.40 (DM 36.40)

Table des matières – Contents – Inhalt:

General Lectures and Symposia:

I. General Lectures
II. Symposium on Visible Migration
III. Symposium on Hearing and Analysis of Voice
IV. The Biology of the Penguins of the Antarctic

Sectional Papers:

V. Morphology · Palaeontology
VI. Systematics · Speciation
VII. Zoogeography · Faunistics
VIII. Ecology · Population
IX. Life History · Behaviour – X. Migration
XI. Folklore

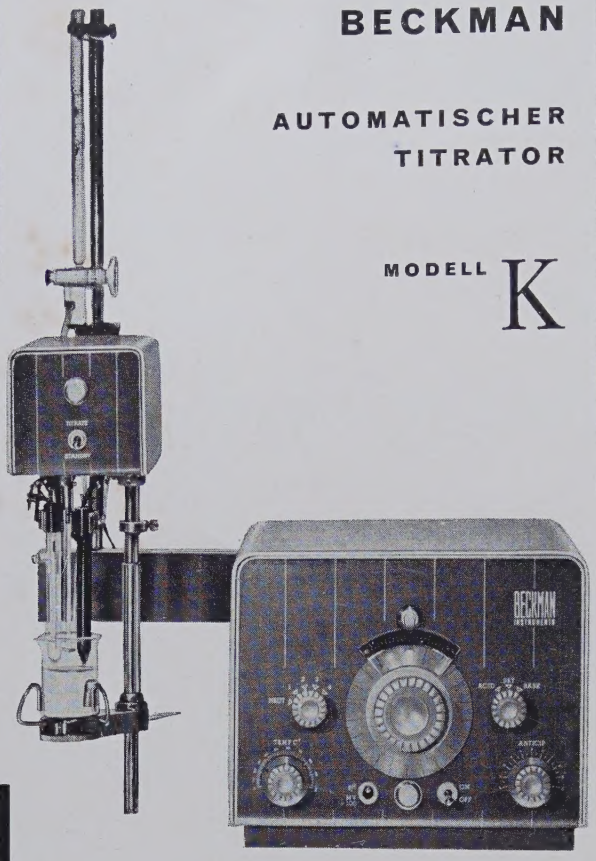
Commandes à votre libraire
Bestellungen an Ihren Buchhändler
Orders through your bookseller

BIRKHÄUSER VERLAG
BASEL / STUTTGART

BECKMAN

AUTOMATISCHER TITRATOR

MODELL K



- Universell verwendbar für pH-, potentiometrische und «dead-stop» -Titrationen
- Automatische pH-Stabilisierung in biologischen und bakteriologischen Kulturen
- Bereich: pH 0 bis 14
  ± 600 mV bis ± 1400 mV
- Automatische Steuerung von wahlweise 1 bis 4 Titrationskolonnen
- Einfachste Bedienung. Verriegelung gegen Fehlmanipulationen
- Automatischer Start der Titration beim Einsetzen des Becherglases
- Elektronische Steuerung des Zugabevolumens in Abhängigkeit des Abstandes vom Endpunkt
- Eingebaute Temperatur-Kompensation von 0° bis 100° C
- Solide, korrosionsfeste Ausführung mit zusätzlicher Kapselung hochisolierter Teile

Zuverlässige Beratung und Service
durch eigenes Fachpersonal

GANZ & CO

BAHNHOFSTR. 40
TEL. (051) 23 97 73

Zürich

Bitte verlangen Sie BECKMAN-Bulletin 244/E

Soeben erschienen:

Début 1956 paraîtra:

Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie

Revue Suisse d'Hydrologie

Vol. XVII, Fasc. 2 (1955)

Subskriptionspreis bis 15. März 1956: Fr. 12.– (DM 12.–)
Prix de souscription jusqu'au 15 mars 1956: Fr. 12.–

INHALT · TABLE DES MATIÈRES

W. Stumm, Die Bedeutung der Radioaktivität in der Wasserversorgung und Abwasserreinigung. – A. A. Quartier, L'Areuse et ses truites. – Rich. A. Vollenweider, Ein Nomogramm zur Bestimmung des Transmissionskoeffizienten sowie einige Bemerkungen zur Methode seiner Berechnung in der Limnologie. – Karl Wolf, Morphometrische Studien an *Daphnia longispina* und quantitative Untersuchungen am Zooplankton des Rotsees. – Gottfried Huber-Pestalozzi, *Crucigenia irregularis* Wille var. *pyrenogera* Chodat als Eutrophiezeiger in einigen Schweizer Seen. – Tarun Kumar Ghose, The Influence of Short-Chain Fatty Acids, Vitamins and Some Other Factor on the Sulphate-Reduction in Lactate Cultures of *Desulphovibrio Desulphuricans* (Beijerinck), Kluyver and van Niel. – A. Hörler, Zur Frage der Zulassung von Küchenkehrrichtzerkleinerungsapparaten (Küchenmühlen).
Symposium sur les problèmes actuels de l'évacuation, du traitement et de l'utilisation des ordures ménagères – O. Jaag, Préface – O. Jaag, Discours d'ouverture, prononcé par le professeur Dr. O. Jaag – O. Jaag, L'évacuation et l'utilisation rationnelles des ordures ménagères; tâche importante de notre temps, et la nécessité d'une planification adéquate des recherches pertinentes par la coopération internationale – F. Pöpel, Aperçu des procédés de compostage d'ordures ménagères appliqués en Europe – M. Knorr, Problèmes d'hygiène soulevés par les ordures ménagères – F. C. Gerretsen, Détermination de la valeur du compost d'ordures ménagères destiné à l'agriculture – W. A. G. Weststrate, Organisation de la transformation des ordures ménagères des villes et de l'écoulement du compost aux Pays-Bas – F. W. G. Pijls, Utilisation du compost d'ordures ménagères dans l'horticulture, expériences faites aux Pays-Bas – R. Fritzsche, Utilisation des ordures ménagères dans les établissements horticoles, vergers et vignobles – R. de Groote, Essais récents de l'utilisation en Belgique du compost des villes en horticulture, en culture maraîchère et en agriculture – J. Keilling, Le traitement des ordures ménagères et leur utilisation en France – L. Gisiger, Utilisation de compost d'ordures ménagères dans l'agriculture suisse – J. Kortleven, Utilisation du compost d'ordures ménagères, expériences faites aux Pays-Bas, dans le domaine de l'agriculture – J. Cosack, Utilisation des ordures ménagères et de la gadoue dans la sylviculture, expériences faites en Allemagne et aux Pays-Bas – E. Surber, Approvisionnement futur en plantes forestières en Suisse: préparation de compost – Résumé et résolutions – P. Mercier, Charles Linder† – Buchbesprechungen – Kurse.

BIRKHÄUSER VERLAG · BASEL / STUTTGART

Eidg. Technische Hochschule

Auf den 1. Oktober 1956 ist die ordentliche

Professur für Zoologie

mit Unterrichtsverpflichtung an den Abteilungen für Forstwirtschaft, für Landwirtschaft und für Naturwissenschaften neu zu besetzen.

Bewerbungen mit Lebenslauf, unter Beilage von allfälligen wissenschaftlichen Publikationen, sind bis am 29. Februar 1956 erbeten an den Präsidenten des Schweiz. Schulrates, Eidg. Technische Hochschule, Zürich 6, der auch weitere Auskünfte erteilt

EXPERIENTIA

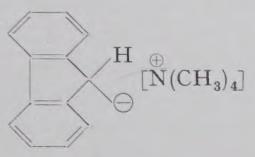
Vol. XII - Fasc. 2 Pag. 41–80 15. II. 1956

Synthesen über Stickstoff-ylide und Phosphor-ylene[a]

Von G. WITTIG[b], Tübingen

In dem letzten Jahrzehnt sind von WITTIG und seinen Mitarbeitern zwei in ihrer Konstitution verwandte Verbindungstypen erschlossen worden, die man vielseitig für präparative Zwecke heranziehen kann. Es handelt sich um die *Stickstoff-ylide* und *Phosphorylene*, deren Bildungsweisen und Strukturen einleitend beschrieben seien.

Das von SCHLENK und HOLTZ[1] synthetisierte *Benzyltetramethyl-ammonium* und das von uns später hergestellte *Fluorenyl-tetramethyl-ammonium*[2]:

$C_6H_5 \cdot \overset{\ominus}{C}H_2[\overset{\oplus}{N}(CH_3)_4]$ und 

sind ihrem Charakter nach als ätherunlösliche Verbindungen ausgesprochene Salze, obwohl dem zentralen Stickstoff jeweilig fünf Kohlenwasserstoffreste zugeordnet sind. Die Beständigkeit namentlich des Fluorenyl-Derivates lud dazu ein, auch das *Phenyltetramethyl-ammonium* durch Umsetzung von Tetramethyl-ammoniumbromid mit Phenyl-lithium herzustellen:

$$[(CH_3)_4N]Br + C_6H_5 \cdot Li \longrightarrow [(CH_3)_4\overset{\oplus}{N}]\overset{\ominus}{C_6H_5} + LiBr$$

Aber die erwartete Ammonium-Verbindung zerfiel sofort in Benzol und in das zwitterionische Gebilde I:

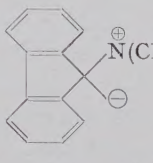
$$[(CH_3)_4\overset{\oplus}{N}]\ \overset{\ominus}{C_6H_5} \longrightarrow I\ (CH_3)_3\overset{\oplus}{N}\text{–}\overset{\ominus}{C}H_2 + C_6H_6,$$

da das Phenyl-Anion als sehr wirksamer Protonenakzeptor ein Wasserstoffion aus einer Methylgruppe herausschlägt und sich zu Benzol stabilisiert.[2]

Das gleichzeitig entstehende Betain I haben wir *Ylid* genannt, um damit zum Ausdruck zu bringen, dass der Kohlenstoff der Methylengruppe durch eine homöopolare Valenz (yl) und durch eine Ionenbeziehung (id) mit dem Stickstoff verknüpft ist. Allerdings lässt sich das ätherunlösliche farblose *Trimethyl-ammonium-methylid* (I) nicht von dem zuvor mitentstandenen Lithiumbromid abtrennen. Ob es sich um ein komplexes Addukt zwischen beiden Partnern handelt oder ob I eine metallorganische Verbindung der Zusammensetzung:

$$[(CH_3)_3\overset{\oplus}{N} \cdot CH_2 \cdot Li]\ \overset{\ominus}{Br}$$

ist, bleibe dahingestellt. Erfahrungsgemäss reagiert dieser neue Verbindungstypus so, als ob er die Konstitution I besässe. Zudem sind gewisse Derivate wie das *Trimethyl-ammonium-fluorenylid*[3]:



das in Äther kaum löslich, aber ockergelb ist, salzfrei isoliert worden.

Analog liess sich *Tetramethyl-phosphonium-bromid* in Gegenwart von lithium-organischen Verbindungen in das zugehörige *Trimethyl-phosphonium-methylid* (IIa)[4] verwandeln:

$$[(CH_3)_4P]\ Br + R \cdot Li \longrightarrow$$

$$\longrightarrow IIa\ (CH_3)_3\overset{\oplus}{P}\text{–}\overset{\ominus}{C}H_2 \longleftrightarrow IIb\ (CH_3)_3P{=}CH_2$$

Da der rein homöopolare Charakter des *Pentaphenyl-phosphors*[5] beweist, dass der Phosphor im Gegensatz zum Stickstoff ein Elektronendezett ausbilden kann, dürfte II zutreffender mit einer P=C-Bindung zu formulieren und sinngemäss – der von STAUDINGER und Mitarbeitern[6] bereits vorgeschlagenen Nomenklatur folgend – als *Trimethyl-phosphin-methylen* (IIb) zu benennen sein. Offenbar liegt hier eine Mesomerie zwischen der Ylid- und Ylen-Form vor, von denen IIa die reaktive Grenzform darstellt.

Triphenyl-methyl-phosphonium-bromid lieferte bei der Einwirkung von Protonenakzeptoren das zu erwartende *Triphenyl-phosphin-methylen*[7], das aus Äther in hellgelben Prismen auskristallisiert.

In diesem Zusammenhang interessiert das Verhalten des *Tetramethyl-stibonium-bromids*, das bei seiner Umsetzung mit Methyl-lithium weder ein Ylid noch Ylen

[a] Nach einem Vortrag, der in Zürich, in Basel und in Budapest Ende November 1955 gehalten wurde.

[b] Chemisches Institut der Universität Tübingen.

[1] W. SCHLENK und J. HOLTZ, Ber. dtsch. chem. Ges. *50*, 274 (1917).

[2] G. WITTIG und Mitarbeiter, Liebigs Ann. Chem. *557*, 193, 201 (1945).

[3] G. WITTIG und G. FELLETSCHIN, Liebigs Ann. Chem. *555*, 133 (1944).

[4] G. WITTIG und M. RIEBER, Liebigs Ann. Chem. *562*, 177 (1949).

[5] G. WITTIG und M. RIEBER, Liebigs Ann. Chem. *562*, 187 (1949).

[6] H. STAUDINGER und Mitarbeiter, Helv. chim. Acta *2*, 638 (1919); *4*, 639, 897 (1921).

[7] G. WITTIG und G. GEISSLER, Liebigs Ann. Chem. *580*, 44 (1953).

bildet, sondern glatt in *Pentamethyl-antimon* übergeht[8]:

$$[(CH_3)_4Sb]\,Br + CH_3 \cdot Li \longrightarrow (CH_3)_5Sb + LiBr$$

Diese metallorganische Verbindung ist eine bei 126 bis 127° siedende farblose Flüssigkeit, deren Aggregatzustand bereits eindrucksvoll auf ihren homöopolaren Zustand hindeutet.

Die beiden Verbindungstypen, die Stickstoff-ylide und Phosphor-ylene, sind nun zu zahllosen Abwandlungen befähigt. Doch seien nur diejenigen Reaktionsweisen in den Vordergrund gerückt, die präparativ bedeutungsvoll erscheinen und Gegenstand eigener Untersuchungen waren.

Die Reaktionsfreudigkeit der *Stickstoff-ylide*, zu denen auch die Diazomethane zu rechnen sind, ist auf die semipolare Bindung am Zentralatom zurückzuführen, die dem benachbarten Kohlenstoff ein freies Dublett und eine Minusladung aufzwingt. Das Streben des freien Elektronenpaares, wieder anteilig zu werden, verleiht dem semipolaren Liganden die Eigenschaften einer metallorganischen Gruppe. Daher kann sich diese nach Art von Grignard-Reaktionen an Carbonyl-Derivate anlagern und sich mit halogenierten Kohlenwasserstoffen kondensieren.

Besonderes Interesse bieten *intra*molekulare Reaktionen, die sich dann vollziehen, wenn am Stickstoff ausser der semipolaren Gruppe ein beweglicher Ligand haftet. Ein Beispiel hierfür ist das *Dimethyl-dibenzyl-ammonium-bromid*, das bei Einwirkung lithiumorganischer Verbindungen in das kurzlebige *Benzylid* übergeht, wie die intermediäre Gelbfärbung der Reaktionsmischung anzeigt. Das nicht isolierbare Ylid lagert sich nun zum *Dimethylamino-dibenzyl* um, da hier die Benzylgruppe kationisch aufgelockert ist und sich daher intramolekular vom positiven Stickstoff zum negativen Kohlenstoff bewegt; gleichzeitig wird das freie Dublett am Kohlenstoff wieder anteilig und das Betain entladen:

Diese Isomerisation nennen wir nach dem Autor, der sie allerdings unter anderen Versuchsbedingungen[9] erstmalig beobachtet hat, die Stevens-Umlagerung.

Der Ylidprozess wurde nun von uns präparativ dahingehend ausgewertet, Kohlenwasserstoffe, die entweder schwer oder sonst gar nicht zugänglich sind, auf der Basis der «Benzylverschiebung» zu synthetisieren.

So lassen sich Phenanthrene einfacher als mittels der Pschorr-Synthese auf einem Wege gewinnen, der am Beispiel des *4,5-Dimethyl-phenanthrens*[10] beschrieben sei. Das leicht zugängliche zyklische Ammoniumsalz III ging bei seiner Umsetzung mit Phenyl-lithium in das Ylid IV über, das sich im Sinne der Stevens-Umlagerung zum Dimethylamino-dihydrophenanthren V isomerisierte. Dessen mit Methyljodid und Silberoxyd hergestellte quartäre Base spaltete bereits bei Raumtemperatur nach Art des Hofmann-Abbaus Trimethylamin und Wasser ab und lieferte den gewünschten Kohlenwasserstoff, der sich mit dem von NEWMAN und WHITEHOUSE[11] anders präparierten identisch erwies.

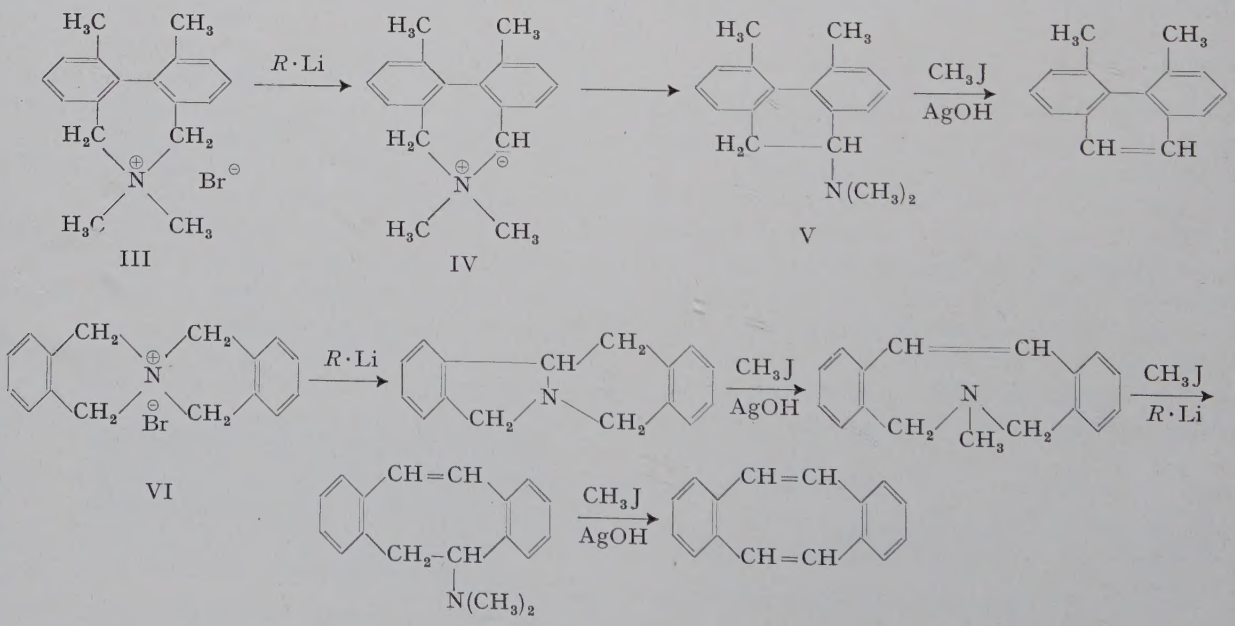
Mit der hier gekennzeichneten Methodik, bei der alternierend die Stevens-Umlagerung und der Hofmann-Abbau zum Zuge kamen, liessen sich analog *Cyclopolyene* aufbauen.

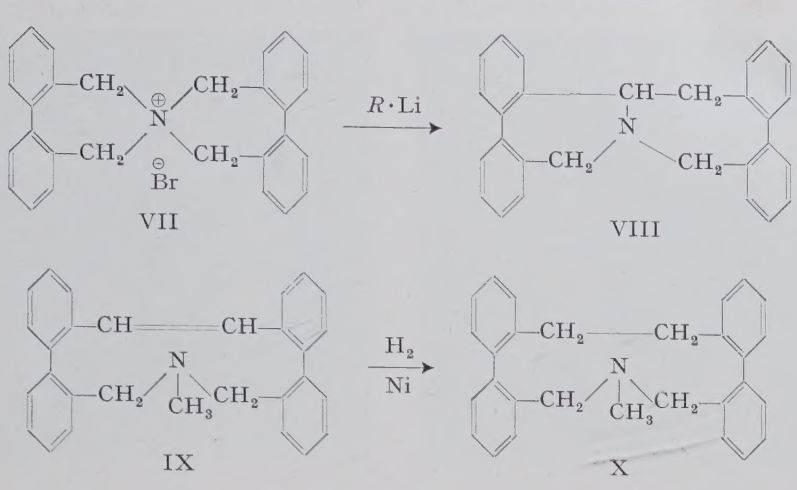
[8] G. WITTIG und K. TORSSELL, Acta chem. Scand. *7*, 1293 (1953).

[9] T. S. STEVENS und Mitarbeiter, J. chem. Soc. London *1930*, 2107, 2119; *1932*, 69, 1932.

[10] G. WITTIG und H. ZIMMERMANN, Chem. Ber. *86*, 629 (1953).

[11] M. S. NEWMAN und H. S. WHITEHOUSE, J. Amer. chem. Soc. *71*, 3664 (1949).





VII VIII IX X

Zur Synthese des *Dibenzo-cyclooctatetraens*[12] ging man von dem zyklischen Ammoniumsalz VI aus, das über die folgenden Stufen abgewandelt wurde (S. 42).

Das Endprodukt war mit dem von FIESER und PECHET[13] auf ganz anderem Wege erhaltenen Kohlenwasserstoff identisch.

Die auch hier in allen Phasen erzielten zufriedenstellenden Ausbeuten ermutigten dazu, nun auch das *Tetrabenzo-cyclododecahexaen*[14] XII zu synthetisieren. Allerdings waren hier grössere Schwierigkeiten zu überwinden. In dem gut gewinnbaren zyklischen Ammoniumsalz VII sind wie in VI die vier Methylengruppen gleichwertig. Daher entstand bei Einwirkung von Phenyl-lithium nur ein einziges Ylid, das sich glatt zu dem in seiner Struktur bewiesenen Amin VIII umlagerte (S. 43).

Dessen Jodmethylat lieferte bei der thermischen Zersetzung der zugehörigen quartären Base zwei isomere Amine vom Smp. 194° und 200°. Dass beide die erwartete C=C-Bindung tragen und strukturidentisch sind, folgt aus ihrer katalytischen Hydrierung, wobei unter Aufnahme von je einem Mol Wasserstoff die zugehörigen Dihydroamine X vom Smp. 140° und 180° entstanden (S. 43).

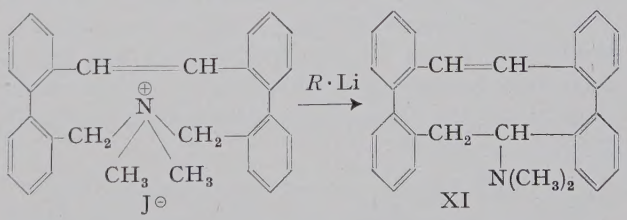
Nun scheint dieses Resultat zunächst gegen die *cis-trans*-Isomerie der ungesättigten Amine IX zu sprechen, da man nach Absättigung der C=C-Bindung nur ein einziges Dihydroamin erwarten sollte. Es stellte sich aber heraus, dass man beide Dihydroamine ineinander in der Schmelze umwandeln kann, wobei sich ein Gleichgewicht beider Formen ($^2/_5$ und $^3/_5$) ausbildet. Wir stossen also hier auf die Erscheinung der Atropisomerie, die nur thermisch zu überwinden ist. Betrachtungen an den Stuart-Briegleb-Kalotten bestätigen, dass die freie Drehbarkeit um die Äthanbindung infolge der dicht aufeinanderstossenden Diphenylsysteme aufgehoben ist.

Die Auswertung der Infrarotspektren der ungesättigten Amine IX gestattete, ihnen mit einem hohen Grad von Wahrscheinlichkeit ihre Konfigurationen zuzuordnen. Danach ist das Amin vom Smp. 194°, das bei 10,5 μ die charakteristische starke Bande der Out-of-plane-Schwingung von *trans*-ständigem Wasserstoff zeigt, das *trans*-Isomere und das andere vom Smp. 200° das *cis*-Isomere.

Die für den Fortgang der Kohlenwasserstoff-Synthese notwendige Quaternisierung der *cis-trans*-isomeren Amine bereitete Schwierigkeiten, da sich die üblichen Methylierungsmittel wie Methyljodid und Dimethylsulfat nicht am Stickstoff anlagern liessen. Diese hier zutage tretende sterische Hinderung am Stickstoff liess sich jedoch durch Einsatz des von MEERWEIN entdeckten *Trimethyl-oxonium-borfluorids* überwinden. Über die glatt sich bildenden Komplexsalze erhielt man entsprechend dem Schema:

$$R_3N + [(CH_3)_3O]BF_4 \longrightarrow [R_3N \cdot CH_3]\,BF_4 \xrightarrow{NaJ} [R_3N \cdot CH_3]J$$

die gewünschten Jodmethylate. Beide wandelten sich bei Einwirkung von Phenyl-lithium im Sinne der Stevens-Umlagerung zu den stereoisomeren Aminen XI vom Smp. 229° und 148° um:



XI

Von diesen führte nur das Jodmethylat des Amins vom Smp. 148° zum Tetrabenzo-cyclododecahexaen. Beim Hofmann-Abbau erhielt man neben Phenanthren drei Kohlenwasserstoffe der Summenformel $C_{28}H_{20}$, die bei 298°, 164° und 237° schmolzen.

Aus dem oxydativen Abbau zur Diphensäure und aus der katalytischen Hydrierung zum Kohlenwasser-

[12] G. WITTIG und Mitarbeiter, Liebigs Ann. Chem. *572*, 3 (1951).
[13] L. FIESER und M. M. PECHET, J. Amer. chem. Soc. *68*, 2577 (1946).
[14] G. WITTIG und Mitarbeiter, Liebigs Ann. Chem. *593*, 127 (1955).

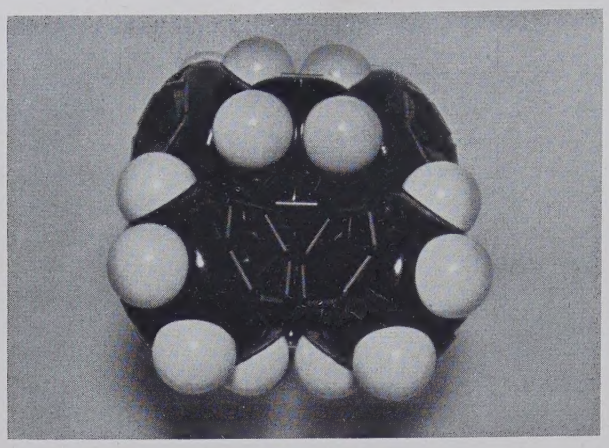


Abb. 1
cis-cis-Form

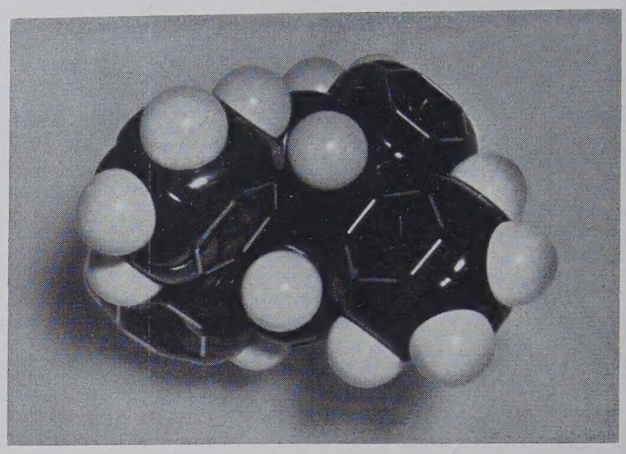


Abb. 2
trans-trans-Form

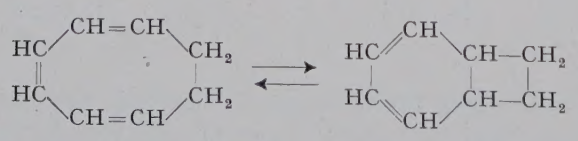
Tetrabenzo-cyclododecahexaen

stoff XIII folgt, dass die Verbindungen vom Smp. 298° und 164° *cis-trans*-Isomere vom erwarteten *Tetrabenzo-cyclododecahexaen* (XII) sind. Die Infrarot-Spektroskopie zeigt, dass der höherschmelzenden Form die *cis-cis*-Konfiguration und der tieferschmelzenden die *trans-trans*-Konfiguration zukommt. Wie die Kalottenmodelle (Abb. 1 und 2) erkennen lassen, sind in der *cis-cis*-Form die Atome spannungsfrei verknüpft, während das *trans-trans*-Isomere eine merkliche Spannung aufweist.

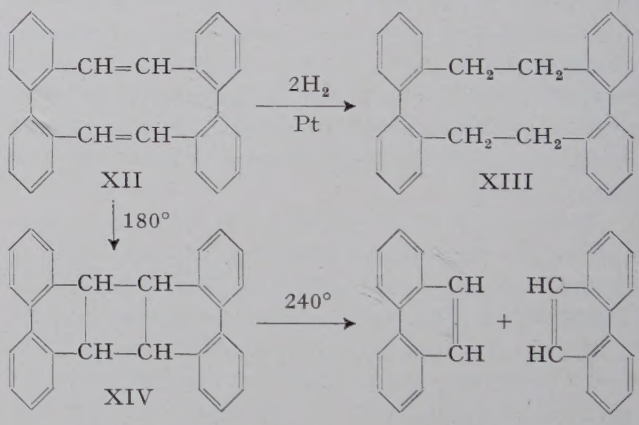
In Übereinstimmung mit diesen Überlegungen ähnelt das UV-Spektrum des *cis-cis*-Isomeren im Kurvenverlauf und in der Lage des Extinktionsmaximums sehr dem des *Dibenzo-cyclooctatetraens*, von dem mit Hilfe des Kalottenmodells nur eine *cis-cis*-Form konstruierbar ist. (Abb. 3)

Da bei allen Cyclopolyenen das in sich geschlossene System von konjugierten Doppelbindungen stark aus der Ebene herausgedrängt ist, wird verständlich, dass diese Kohlenwasserstoffe farblos sind.

Während nun das *cis-cis*-Isomere XII beim Erhitzen unverändert sublimierte, lagerte sich die *trans-trans*-Form bei 180° in den vorher erwähnten Kohlenwasserstoff vom Smp. 237° um. Seine Indifferenz gegenüber Kaliumpermanganat und gegenüber der katalytischen Hydrierung weisen auf die Struktur XIV hin, derzufolge der Cyclododecahexaen-Ring (XII) entsprechend dem bekannten Übergang vom Cyclooctatrien zum Bicyclo-octadien[15]:



zu einem Tricyclo-dodecatetraen (XIV) formiert wird. Betrachtungen am Kalottenmodell bestätigen, dass nur im *trans-trans*-Kohlenwasserstoff XII die beiden olefinischen C=C-Bindungen so dicht genähert sind, dass ein Cyclobutan-Ring geschlossen werden kann. Streng beweisend für die Konstitution XIV der Verbindung vom Smp. 237° ist ihr Verhalten bei höherer Temperatur; bei 240° zerfiel sie quantitativ in zwei Molekeln Phenanthren:

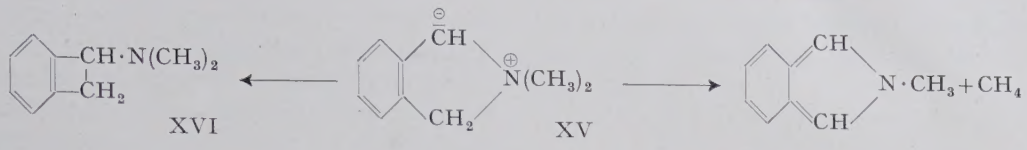


Die hier immer wieder angewandte kombinierte Methodik der Stevens-Umlagerung und des Hofmann-Abbaus wurde nun zur Synthese des noch unbekannten *Benzo-cyclobutadiens* eingesetzt. Das *N·N-Dimethyl-isoindolinium-bromid* bildete mit lithium-organischen Verbindungen das erwartete Ylid XV, wie an der vorübergehenden Gelbfärbung zu erkennen war. Aber XV ging nicht die Stevens-Isomerisation zum Amin XVI ein, das dann über sein Jodmethylat zum Benzocyclobutadien hinüberleiten sollte. Statt dessen bildete sich unter Methan-Entwicklung ausschliesslich *N-Methyl-isoindol*[16] (S. 45).

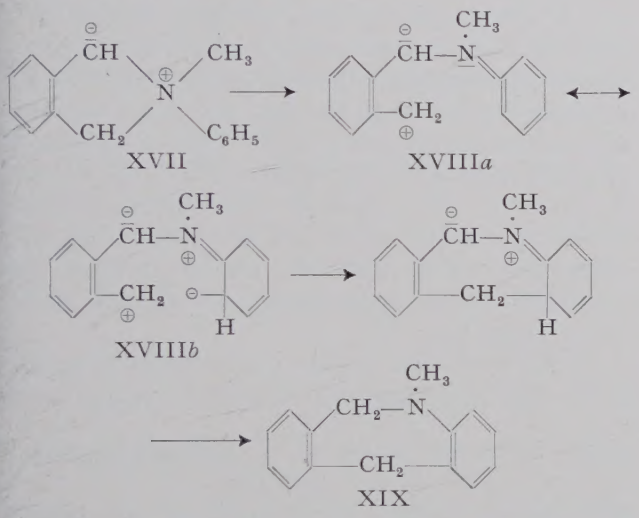
Erwähnt in diesem Zusammenhang sei das *N-Methyl-N-phenyl-isoindolinium-bromid*, da dessen Ylid XVII eine Isomerisation einging, die bislang noch un-

[15] Vgl. dazu K. ALDER und H. JACOBS, Chem. Ber. *86*, 1529 (1953).

[16] G. WITTIG und W. SCHOCH, Liebigs Ann. Chem. *572*, 20 (1951).



bekannt war. Man erhielt nämlich dabei das *Aza-N-methyl-cycloheptadien* XIX, wie durch Synthese des Vergleichspräparates auf anderem Wege bewiesen wurde[17]. Der Chemismus der Umlagerung ist so zu interpretieren: Im zunächst aus dem Isoindoliniumsalz entstehenden Ylid löst sich die Methylengruppe kationisch vom Stickstoff unter Bildung des Betains XVIII*a*. Hier ist so wenig wie beim vorher genannten Ylid XV ein Vierringschluss im Sinne einer Stevens-Isomerisation möglich, da dem die Ringspannung entgegenwirkt. Statt dessen wird über die mesomere Form XVIII*b*[18] das Dublett am Benzolkern mit dem Kohlenstoff des Methylen-Kations anteilig, und der dabei entstehende Siebenring aromatisiert sich zum gefundenen Amin XIX:



Dieser Vorgang ist also mit einer elektrophilen Substitution am Anilinkern gekoppelt und hat daher weder mit der Stevens- noch mit der in anderem Zusammenhang aufgefundenen Sommelet-Umlagerung[19] irgend etwas gemein, sondern repräsentiert einen dritten Typus der Ylid-Isomerisationen.

Die bis jetzt beschriebenen Synthesen haben zur gemeinsamen Basis, dass gewisse quartäre Ammoniumsalze bei Einwirkung von Protonenakzeptoren in ihre Ylide übergehen, die ausserordentlich reaktiv sind, da sie nach einer Entladung streben. Diese betonte Reaktionsfreudigkeit zeigen nun die eingangs genannten *Phosphor-ylene* nicht, da – wie gesagt – der Phosphor im Gegensatz zum Stickstoff dazu befähigt ist, seine äussere Elektronenschale zu einem Dezett aufzuweiten, und daher das freie Dublett am Nachbarkohlenstoff unter Ausbildung einer P=C-Bindung zu sich herüberzieht. Da aber dieser Entladungsprozess am Bindungsort entsprechend der Mesomerie zwischen der Ylid- und Ylen-Form nur ein partieller ist, sind Ligandenverschiebungen nach Art einer Stevens-Umlagerung hier nicht unmöglich, sondern nur erschwert, wie eingehende Untersuchungen dargetan haben[20]. Der Charakter einer immerhin partiellen Doppelbindung zusammen mit dem Streben des Phosphors zur Dezettbildung prägen die Phosphorylene zu eigenwilligen Verbindungen, deren spezifische Reaktionsweise die Grundlage zu andersartigen Synthesen liefert.

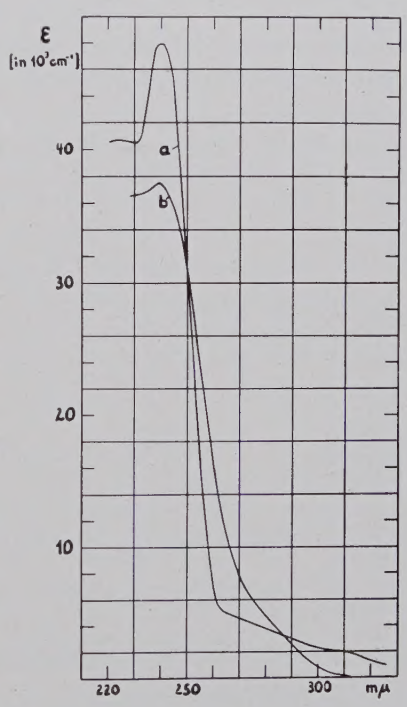


Abb. 3

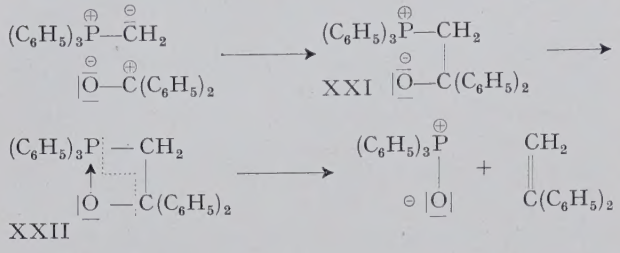
a Dibenzo-cyclooctatetraen
b *cis-cis*-Tetrabenzo-cyclododecahexaen

Die Untersuchungen hierüber nahmen ihren Ausgang von der Beobachtung, dass sich *Triphenyl-phosphinmethylen* (XX) mit *Benzophenon* in einem Reaktionsgang bei Raumtemperatur zu *Triphenyl-phosphinoxyd* und *asymm. Diphenyl-äthylen* umsetzte[7]:

XX $(C_6H_5)_3P=CH_2 + (C_6H_5)_2CO \longrightarrow (C_6H_5)_3PO + (C_6H_5)_2CO$

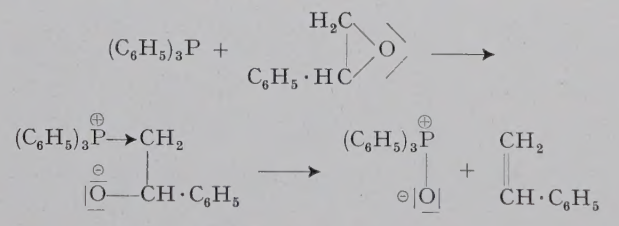
[17] G. WITTIG und Mitarbeiter, Liebigs Ann. Chem. *594*, 89 (1955).
[18] In den nicht frei existierenden Formen XVIII*a* und *b* findet der Übergangszustand von XVII nach XIX seinen bildhaften Ausdruck.
[19] G. WITTIG und Mitarbeiter, Liebigs Ann. Chem. *560*, 116, (1948); *572*, 1 (1951).
[20] G. WITTIG und H. LAIB, Liebigs Ann. Chem. *580*, 57 (1953).

Der merkwürdige Vorgang kann nur so gedeutet werden, dass sich zunächst das Phosphor-ylen über seine mesomere Ylidform an die polar aufgerichtete C=O-Bindung des Ketons zum Betain XXI addiert:



Dem Drängen des Phosphors zur Dezettbildung entgegenkommend, wird nun eines der freien Dublette am Sauerstoff mit dem Zentralatom anteilig, und über den Vierring XXII hinweg erfolgt der Zerfall zu Triphenylphosphinoxyd und Diphenyl-äthylen, wobei die bindenden Dublette von den Haftatomen im Sinne der gestrichelten Linie abgelöst werden. Dass zunächst das Betain XXI entsteht, folgt aus der Umsetzung von *Benzaldehyd*[22] mit Triphenyl-phosphin-methylen, da hierbei das zwitterionische Addukt isolierbar ist. Dieses zerfällt erst bei 60–70° in Triphenyl-phosphinoxyd und nun *Styrol*.

Wie die jüngsten Arbeiten[21] gezeigt haben, gelangt man zu denselben Endprodukten, die man bei der Umsetzung von XX mit Benzaldehyd erhielt, wenn man *Styroloxyd* mit *Triphenyl-phosphin* auf 165° erhitzt. Während *Styrol* zum grössten Teil abdestilliert, verbleibt in angenähert gleicher Ausbeute (um 85%) Triphenyl-phosphinoxyd im Kolben. Sehr wahrscheinlich mündet der sich hier abspielende Vorgang entsprechend dem Schema:



in den bei der Reaktion von XX mit Carbonylverbindungen beschriebenen Prozess ein.

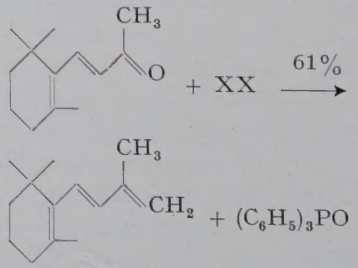
Die Reduktion von Äthylenoxyden mittels Triphenyl-phosphins wird dann präparativ bedeutungsvoll, wenn jene nicht aus den zugehörigen Olefinen, sondern zweckmässig anders gewonnen werden. Als Beispiel sei der *β-Phenyl-glycidester* aufgeführt, der auf dem Wege der Darzens-Kondensation aus Benzaldehyd und Chloressigester hergestellt wird. Zur Reduktion wurde er mit Triphenyl-phosphin in Gegenwart von *Hydrochinon* erhitzt, das in doppelter Funktion als Säure die Sprengung des Dreiringes katalysieren und als Inhibitor die Polymerisation der entstehenden ungesättigten Verbindung hintanhalten sollte. Die Umsetzung erfolgte bereits bei 125°, wobei *Zimtsäureester* und Triphenyl-phosphinoxyd in 75%iger Ausbeute zu isolieren waren.

Die eingehend studierten Olefinierungen von Carbonyl-Derivaten[22] mit Triphenyl-phosphin-methylen führten zu dem Resultat, dass der Vorgang einerseits schonend verläuft und andererseits konstitutionell einheitliche Verbindungen liefert. So wandelte sich *p-Nitro-benzophenon* bei Einwirkung von XX in *p-Nitro-diphenyl-äthylen* um, ohne dass also die Nitrogruppe in Mitleidenschaft gezogen wurde. Ferner konnte das Keton XXIV, das aus dem bei 100° schmelzenden Kohlenwasserstoff XXIII hergestellt wurde, mit XX in guter Ausbeute in die Ausgangsverbindung zurückverwandelt werden (S. 46).

Bei der üblichen Synthese derartiger Olefine, die man durch Addition von Methyl-magnesiumhalogenid an die Carbonylgruppe und durch nachfolgende Dehydratisierung zu gewinnen versucht, erhält man im allgemeinen Isomerengemische, da sich die C=C-Bindung vorzugsweise zwischen sekundärem, bzw. tertiärem Kohlenstoff ausbildet. Diese in der Saytzeff-Regel zum Ausdruck gelangende Erfahrung verliert bei Anwendung unserer neuen Methodik ihre Gültigkeit; denn die Phosphor-ylene liefern bei ihrer Umsetzung mit Aldehyden und Ketonen stets Olefine, in denen die C=C-Bindung dort ausgebildet ist, wo ursprünglich die C=O-Gruppe sass.

Daher konnte nach dem neuen Verfahren erstmalig isomerenfrei das *Cyclohexyliden-methan* entsprechend:

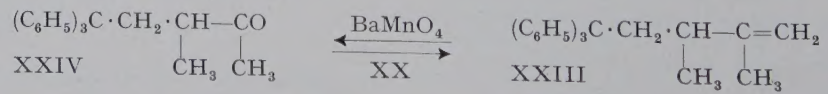
synthetisiert werden. Auch mehrfach ungesättigte Carbonyl-Derivate liessen sich bei Einwirkung von XX strukturell eindeutig olefinieren; zum Beispiel ging *β-Jonon* unter diesen Bedingungen in das eindeutig definierte *β-Jonyliden-methan*[23] über:

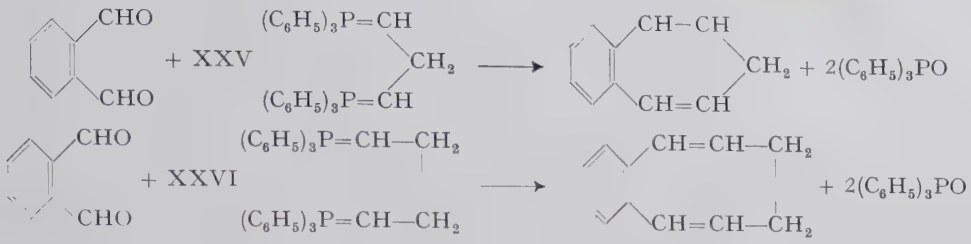


[21] G. WITTIG und W. HAAG, Chem. Ber. *88*, 1654 (1955).

[22] G. WITTIG und U. SCHÖLLKOPF, Chem. Ber. *87*, 1318 (1954).

[23] G. RAPP, Diss. Tübingen 1955.



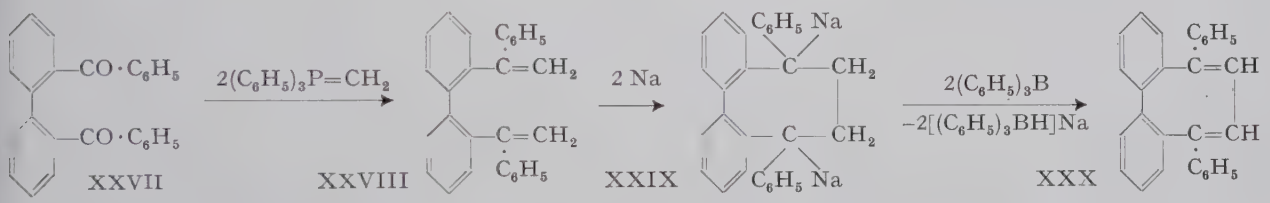


Wie noch unveröffentlichte Untersuchungen[24] gezeigt haben, lassen sich auch *bifunktionelle Phosphor-ylene* aus Dihalogeniden über die zugehörigen Diphosphoniumsalze mit lithium-organischen Verbindungen herstellen. Das aus Trimethylendibromid so bereitete Ylen XXV lieferte bei seiner Kondensation mit *Phthaldialdehyd* in 35%iger Ausbeute *Benzo-cycloheptadien* (S. 47).

Entsprechend wurde das homologe Ylen XXVI mit dem Dialdehyd zum *Benzo-cyclooctatrien* umgesetzt (S. 47).

Dieser Kohlenwasserstoff bildete wie das Cyclooctatrien selbst[25] mit Silbernitrat ein kristallisiertes Addukt, über das eine Reinigung möglich war.

Weiterhin sei ein modifiziertes Verfahren zur Synthese von Cyclopolyenen beschrieben, in das bei einer Stufe ebenfalls eine Olefinierung mit Phosphor-ylenen eingeschaltet ist[26]. Der Weg vom Dibenzoyl-diphenyl zum *Diphenyl-dibenzo-cyclooctatetraen* führt über die folgenden Etappen:



Das Diketon XXVII lieferte bei seiner Umsetzung mit 2 Molen XX in 80%iger Ausbeute den ungesättigten Kohlenwasserstoff XXVIII, der nach dem üblichen Grignard-Verfahren nicht erhältlich ist. Bei Einwirkung von Natrium schloss sich der Ring zu XXIX, und in ebenfalls guten Ausbeuten liess sich bei Einwirkung von Triphenyl-bor[27] die Abspaltung von 2 Molen Natriumhydrid erzwingen, wobei das Cyclopolyen XXX entstand. Diese Verbindung liegt dem Kalottenmodell zufolge in der Wannenform vor.

Abschliessend seien einige Olefinierungen erwähnt, die darauf hinweisen, dass sich die Phosphin-methylen-Methode auch zur Synthese gewisser Naturstoffe eignet. So haben INHOFFEN und Mitarbeiter[28] aus dem Keton XXXI mit XX ein Methylenderivat hergestellt, für das sie die Konstitution XXXII eines «*trans*»-*Vitamin* D_2-Derivates wahrscheinlich gemacht haben (S. 47).

Auf der Basis der neuen Methodik haben BOHLMANN und VIEHE[29] die natürlich vorkommenden Polyene *Oenanthetol* (XXXIII) und *Cicutol* (XXXIV) synthetisiert, deren hier gebrachte Formulierungen die Kondensationsstellen erkennen lassen (S. 47).

POMMER[30] gelang, wie die schematische Formel XXXV zeigt, die Synthese des *Dehydro-β-carotins* (S. 48).

Ebenfalls in Zusammenarbeit mit POMMER[30] wurde ein neuer Zugang zum *Vitamin A* erschlossen. γ-Brommethyl-crotonsäure-ester wurde mit Triphenyl-phosphin zum Phosphoniumsalz XXXVI vereinigt, das bei

[24] P. DUFFNER, Diplomarbeit Tübingen 1955. – U. SCHÖLLKOPF, Diss. Tübingen 1955.

[25] Vgl. A. C. COPE und F. A. HOCHSTEIN, J. Amer. chem. Soc. *72*, 2515 (1950).

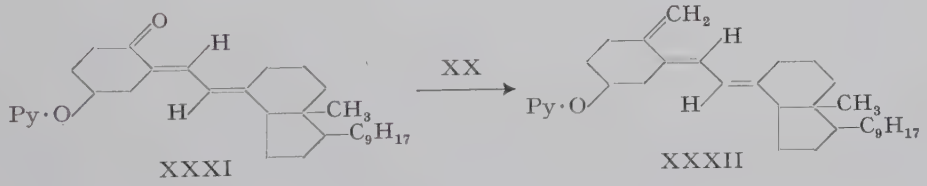
[26] W. STILZ, Diss. Tübingen 1955.

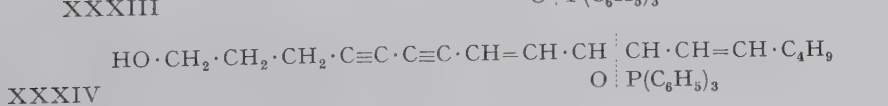
[27] Vgl. G. WITTIG und Mitarbeiter, Liebigs Ann. Chem. *563*, 113 (1949).

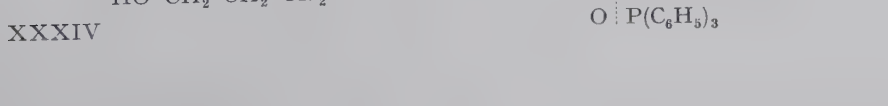
[28] H. H. INHOFFEN und Mitarbeiter, Angew. Chem. *67*, 276 (1955).

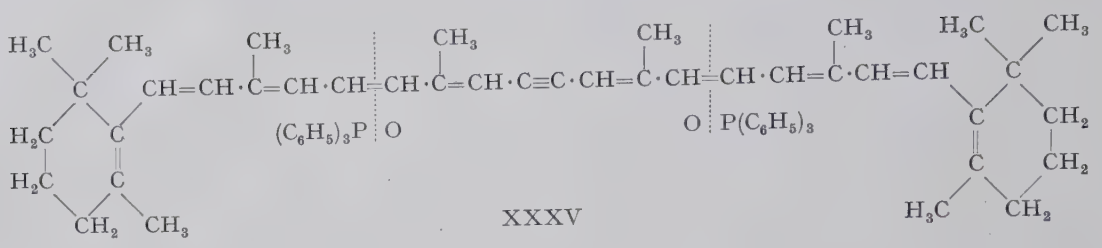
[29] F. BOHLMANN und H.-G. VIEHE, Chem. Ber. *88*, 1245, 1347 (1955).

[30] Deutsche Bundes-Patent-Anmeldung der Badischen Anilin- und Sodafabrik, Ludwigshafen am Rhein (Erfinder: G. WITTIG und H. POMMER).

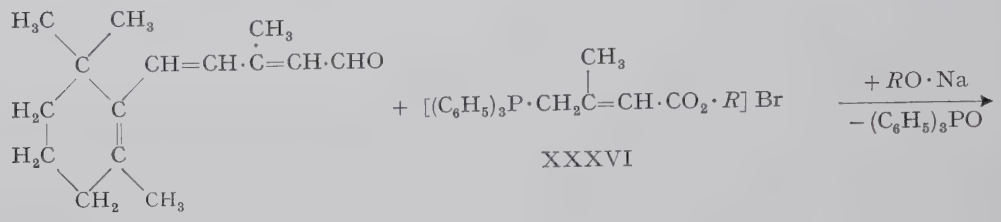




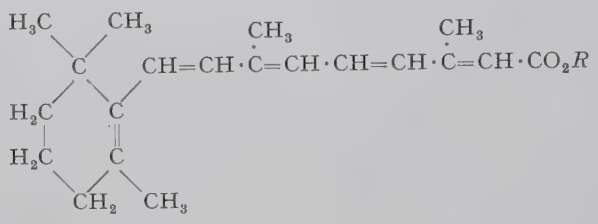




XXXV



XXXVI



der Umsetzung mit *β-Jonyliden-acetaldehyd* in Gegenwart von Natrium-alkoholat in Alkohol *Vitamin-A-säure-ester* lieferte (S. 48).

Das neue Verfahren erwies sich einfacher als die bislang bekannten und führt in zufriedenstellender Ausbeute zum Endprodukt.

Rückblickend auf die hier zusammengefassten theoretischen Betrachtungen mit ihren experimentellen Konsequenzen ergibt sich, dass die im letzten Jahrzehnt gestaltete organische Anionochemie[31] – als Gegenstück zu der von MEERWEIN inaugurierten und seitdem eingehend bearbeiteten Kationochemie – nicht nur wissenschaftlich interessierende Probleme aufwirft, sondern auch beginnt, sich praktisch auszuwirken. Die *Stickstoff-ylide* und *Phosphor-ylene*, als Anwendungsbeispiele aus der Anionochemie, sind präparative Hilfsmittel geworden, die man vielseitig einsetzen kann und welche erst den Beginn einer Entwicklung abstecken, die in ihrem Umfange noch nicht abzusehen ist.

[31] G. WITTIG, Angew. Chem. *66*, 10 (1954).

Summary

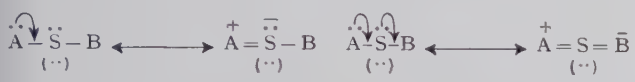
The action of proton acceptors on quaternary ammonium- or phosphonium-salts produces unusually reactive compounds, which are called N-ylids or P-ylens respectively. The N-ylids, which undergo the Stevens rearrangement, have found preparative application in newly developed syntheses of phenanthrene derivatives and cyclopolyenes. Appropriate representatives of the ylids are transformed into the formerly unknown isoindoles. The P-ylens also possess the noteworthy ability to convert aldehydes and ketones to the corresponding homogeneous olefines. With their help, new approaches to cyclopolyenes have been opened up, and naturally occurring substances containing polyene and polyenine chains, such as β-carotene, oenanthetol and vitamin A, have been synthesized.

Brèves communications - Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Can the Sulphur Bridge be Considered as a Relay of Conjugation?

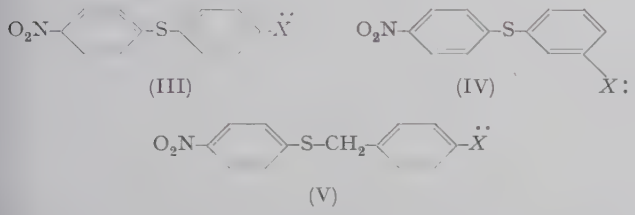
The problem of the "expansion of the valence shell of sulphur" can be considered—as is well known—from two different aspects: (i) sulphur "acceptor" as formulated in (I); (ii) sulphur "donor-acceptor" as in (II):



(I) (II)

In both cases, sulphur does expand its eight-electrons-shell (to 10 electrons), but in (II)—differently from (I)—sulphur seems to behave as a true "relay of conjugation", analogously, for instance, to the vinyl group

Our new researches[1] deal with the comparison of the UV. spectra of the following series of compounds (III, IV, V) (X = electron-donor substituent)



(III) (IV) X:

(V)

where for the compounds (IV) and (V) the effect of the substituent cannot reach the NO_2 group:

The data reported in the Table make it evident that the longer wave-length band in sulphides—assigned to

(VI)

the excited chromophoric system (VI)—are similarly modified by the molecular residue, either when *p*-substituted phenyl (III), or *m*-substituted phenyl (IV) or *p*-benzyl (V) groups are involved; moreover, analogous modification does take place when the substituent in the phenyl-group has its auxochromic effect "hindered" by salt formation (see amino-derivatives): in this case, moreover, we have noticeable bathochromic shift.

Such modifications affecting the chromophore (VI), depending from the substituted phenyl or benzyl, can only be due to an effect inductive in nature and origin. Therefore the claimed through-conjugation

finds no experimental support in our examples, in contrary to the conclusion of Szmant and McIntosh[2].

A. Mangini and R. Passerini

Institute of Industrial Chemistry, University of Bologna, October 15, 1955.

Riassunto

Vengono studiati gli spettri di assorbimento u.v. del nitro-difenil-, nitro-fenil-benzil-solfuro e loro derivati

[1] Previous researches: A. Mangini *et al.*, J. Chem. Soc. *1*, 68 (1952); Gazz. chim. ital. *84*, 3, 36, 47, 73, 606 (1954); J. Phys. et le Radium, *15*, 625 (1954).

[2] H. H. Szmant and J. J. McIntosh, J. Amer. chem. Soc. *73*, 4356 (1951).

Ultra violet absorption spectra of compounds III, IV and V (λ, mμ; log ε in brackets).

X =	Solvent	O_2N–C$_6$H$_4$–S–C$_6$H$_4$– (4 / 3)		$\Delta\lambda$		Solvent	O_2N–C$_6$H$_4$–S–CH_2–C$_6$H$_4$–X	
		3	4	3	4			$\Delta\lambda$
H[ad]	H	325 (4·20)	325 (4·20)	0	0	C	329 (4·17)	0
OCH_3[bc]	H or C	328 (4·17)	327 (4·17)	3	2	C	331 (4·19)	2
OH[bc]	C	328 (4·14)	329 (4·18)	3	4	–	–	–
O[c]	NaOH	357 (4·05)	345 (4·14)	32	20	–	–	–
NH_2[ac]	C	331 (4·16)	331 (4·16)	6	6	–	–	–
NHAc[ac]	H or C	328 (4·13)	325 (4·03)	3	0	–	–	–
NH_2·HCl	HCl	343 (4·01)	345 (4·06)	18	20	–	–	–
$N(CH_3)_2$[ac]	C	331 (4·21)	324 (4·15)	6	–1	C	322 (4·10)	–7
$N(CH_3)_2$·HCl[c]	HCl	342 (4·18)	345 (4·05)	17	20	HCl	342 (4·08)	13

H = *n*-hexane; C = cyclo-hexane; NaOH *N*/10; HCl *N*/1.

References:

[a] A. Mangini and R. Passerini, J. chem. Soc. *1952*, 1168.

[b] A. Mangini, R. Passerini, and S. Serra, Gazz. chim. ital. *84*, 47 (1954).

[c] Experimental details will be published elsewhere.

[d] W. R. Waldron and E. E. Reid, J. Amer. chem. Soc. *45*, 2399 (1923).

X-sostituiti: dove X è eguale ad NH_2, $N(CH_3)_2$, OH, OCH_3 in posizione para- o meta- nel fenile non nitro-sostituito rispetto allo zolfo.

Viene dimostrato che una coniugazione che si estenda da un fenile all'altro, attraverso il ponte di zolfo nella serie dei difenil-solfuri non è suffragata dai fatti spettroscopici.

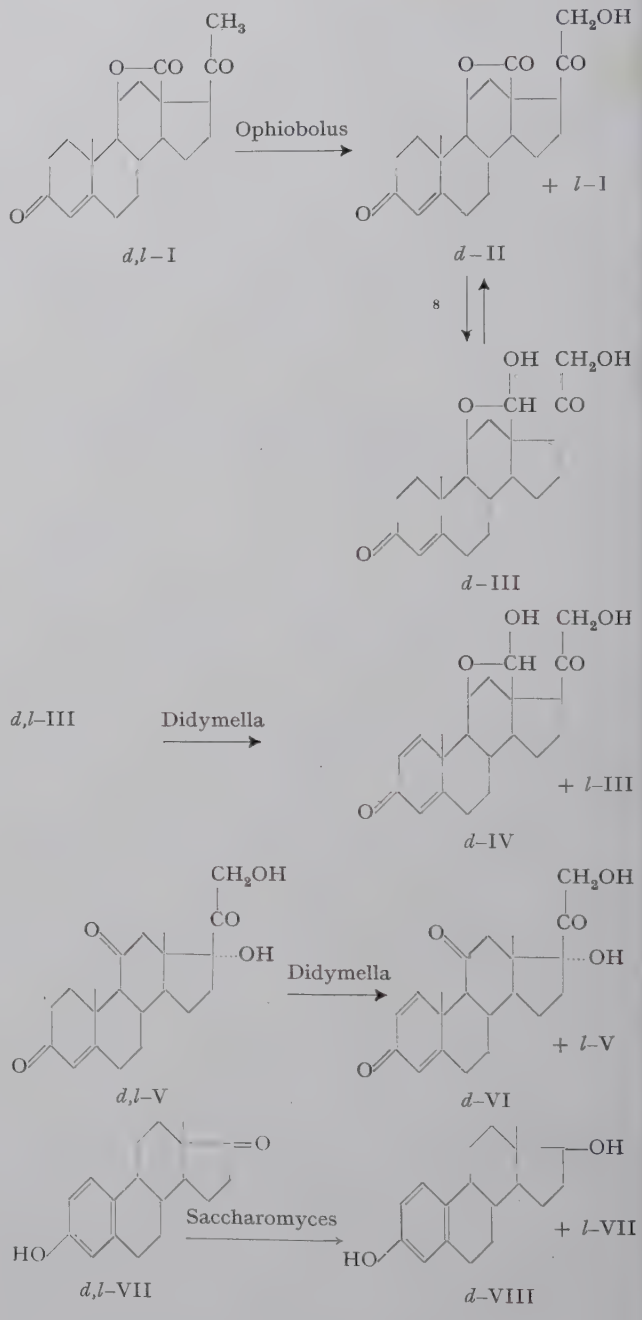
Mikrobiologische Spaltung razemischer Steroide[1]. Synthese von *d*-Aldosteron[2,3]

Im Verlaufe der Totalsynthese des razemischen Aldosterons[4] haben wir kürzlich die Gewinnung des *d,l*-Δ^4-3,20-Dioxo-11β-oxy-pregnen-18-säure-lactons-(18 → 11) der Formel I beschrieben.

Wir stellten uns die Aufgabe, dieses Methylketon nach der von uns früher gefundenen mikrobiologischen Methode[5] in 21-Stellung zu hydroxylieren, um damit das bewährte, aber mehrstufige Oxalesterverfahren[4,6] zu umgehen. Bei der Einwirkung von *Ophiobolus herpotrichus* (Fr.) Sacc. auf razemisches I wurde dieses nur teilweise zum 21-Oxy-lacton II umgesetzt. Das durch präparative Papierchromatographie isolierte Hydroxylierungsprodukt war überraschenderweise stark optisch aktiv und stellte die reine *d*-Form von II dar. In seinen Eigenschaften stimmte es mit der aus natürlichem *d*-Aldosteron (III) gewonnenen, optisch aktiven Verbindung II[7] überein: Smp. 208–220°; Mischschmelzpunkt 207–219°; $[\alpha]_D^{27} = +120° \pm 10°$, $c = 0{,}171$ in Azeton; IR.-Spektrum siehe Abb. 1 A. Letzteres erwies sich als identisch mit dem Spektrum, Abb. 1 B, der *d*-Verbindung II aus *d*-Aldosteron sowie mit dem Spektrum, Abb. 1 C, der nach der Oxalestermethode totalsynthetisch erhaltenen, razemischen Verbindung II[4]. Das nicht umgesetzte Ausgangsmaterial besass eine negative optische Drehung: $[\alpha]_D^{24} = -154° \pm 10°$. Das Ergebnis zeigt, dass dieses Pilzenzym vom razemischen Ausgangsmaterial selektiv nur den *d*-Antipoden hydroxylierte und die *l*-Form unangegriffen liess.

Da das optisch aktive, aus natürlichem Aldosteron (III) gewonnene 21-Oxy-lacton II auf chemischem Wege in Aldosteron zurückverwandelt worden ist[8], stellt die beschriebene, optisch spezifisch verlaufende mikrobiologische Hydroxylierung die bisher noch fehlende letzte Stufe in der Synthese des *d*-Aldosterons dar.

Angeregt durch dieses Resultat haben wir auch andere mikrobiologische Reaktionen auf ihre Stereospezifität untersucht. Razemisches Aldosteron (III)[4] wurde mit der in 1-Stellung dehydrierenden *Didymella lycopersici* Kleb.[9] inkubiert, worauf wir das neue *d*-1-Dehydroaldosteron (IV) (IR.-Banden u.a. bei 2,82μ, 2,95μ, 5,87μ, 6,01μ, 6,17μ, 6,24μ und 6,91μ; 21-Monoazetat: Smp. 182–185°, IR.-Banden u. a. bei 2,81μ, 5,74μ, 6,01μ, 6,16μ und 6,23μ) und *l*-Aldosteron isolierten. Weiter gewannen wir durch Einwirkung des gleichen Pilzstammes auf *d,l*-Cortison (V)[10] neben *l*-Cortison das be-



1 135. Mitteilung *Über Steroide*; 134. Mitteilung siehe F. W. Kahnt, R. Neher und A. Wettstein, Exper. *11*, 446 (1955).

2 «Über Synthesen in der Aldosteronreihe II». I siehe J. Schmidlin, G. Anner, J.-R. Billeter und A. Wettstein, Exper. *11*, 365 (1955). Zur Nomenklatur siehe J. v. Euw, R. Neher und T. Reichstein, Helv. chim. Acta *38*, 1423, Fussnote 3 (1955). Einen andern Nomenklaturvorschlag machen A. Horeau, J. Jacques und J. M. A. Petit, Bull. Soc. chim. France *1955*, 1304.

3 8. Mitteilung: *Mikrobiologische Reaktionen*; 7. Mitteilung siehe E. Vischer, Ch. Meystre und A. Wettstein, Helv. chim. Acta *38*, 1502 (1955).

4 J. Schmidlin, G. Anner, J.-R. Billeter und A. Wettstein, Exper. *11*, 365 (1955).

5 Ch. Meystre, E. Vischer und A. Wettstein, Helv. chim. Acta *37*, 1548 (1954). – Siehe auch A. Zaffaroni, C. C. Campillo, F. Cordoba und G. Rosenkranz, Exper. *11*, 219 (1955).

6 H. Ruschig, Angew. Chem. *60A*, 247 (1952); Chem. Ber. *88*, 878 (1955).

7 S. A. Simpson, J. F. Tait, A. Wettstein, R. Neher, J. v. Euw, O. Schindler und T. Reichstein, Exper. *10*, 132 (1954); Helv. chim. Acta *37*, 1206, 1215, 1221 (1954). – J. v. Euw, R. Neher und T. Reichstein, Helv. chim. Acta *38*, 1423 (1955); Verbindung Nr. 885: Smp. roh 203–218°, Smp. rein 215–228°. 21-Azetat = Verbindung Nr. 875: Smp. 200°, $[\alpha]_D^{24} = +117° \pm 3°$ in $CHCl_3$.

8 J. v. Euw, R. Neher und T. Reichstein, Helv. chim. Acta *38* 1423 (1955).

9 E. Vischer, Ch. Meystre und A. Wettstein, Helv. chim. Acta *38*, 1502 (1955).

10 L. H. Sarett, G. E. Arth, R. M. Lukes, R. E. Beyler, G. I. Poos, W. F. Johns und J. M. Constantin, J. Amer. chem. Soc. *74*, 4974 (1952), und spätere Veröffentlichungen. – Wir danken Dr. M. Tishler und Dr. L. H. Sarett bestens für die freundliche Überlassung einer Probe dieser totalsynthetischen Verbindung.

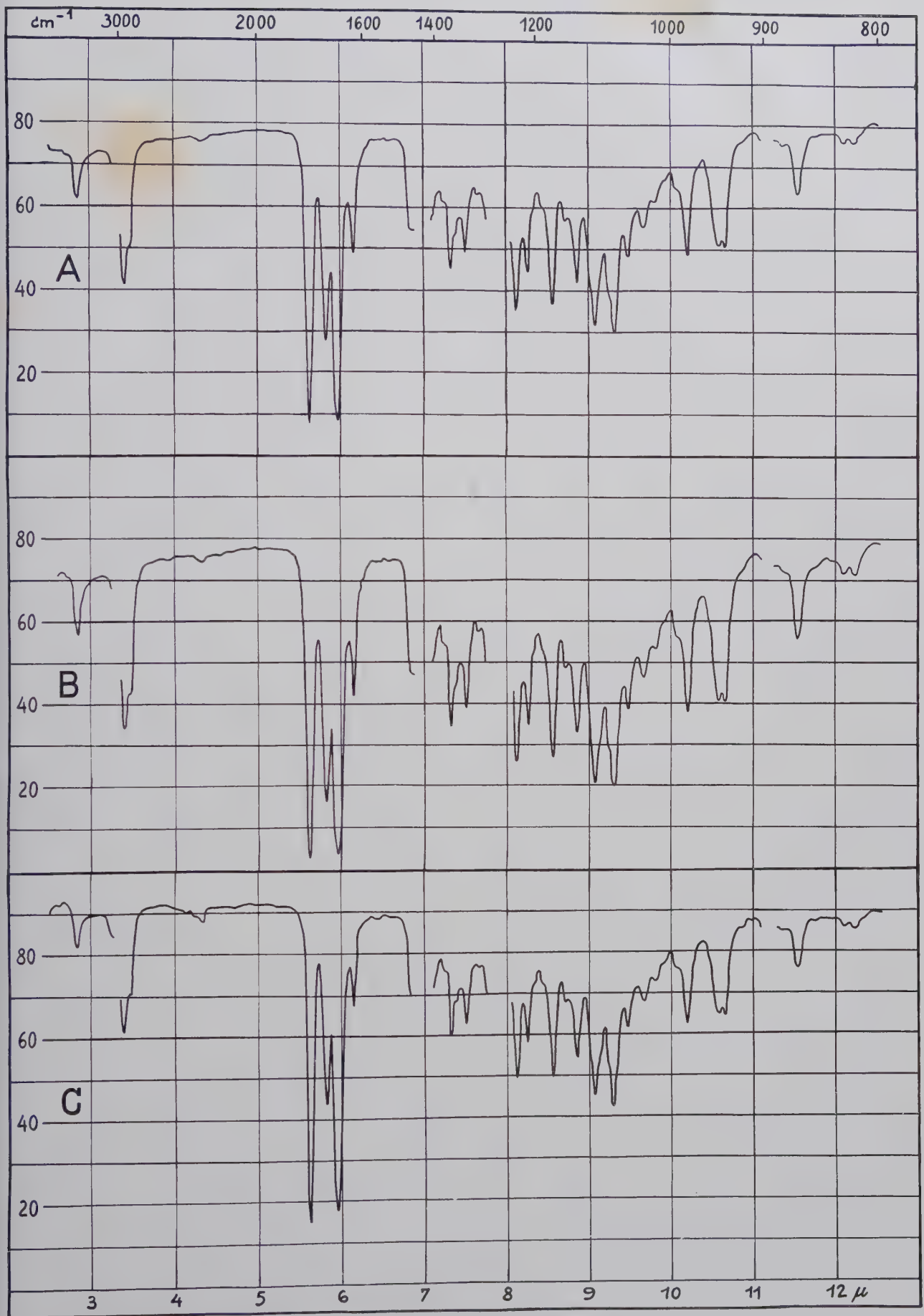


Abb. 1. IR.-Absorptionsspektren in CH_2Cl_2, kompensiert mit reinem CH_2Cl_2, Schichtdicke 0,2 mm*. *A* Synthetisches, mikrobiologisch gewonnenes *d*-21-Oxy-lacton II. *B* Aus natürlichem Aldosteron-21-monoazetat gewonnenes *d*-21-Oxy-lacton II (REICHSTEINS Verbindung Nr. 885[7]). *C* Totalsynthetisches *d,l*-21-Oxy-lacton II[4]).

* Aufgenommen mit einem Perkin-Elmer-Spektrophotometer, Modell 21, mit NaCl-Prisma; Resolution 4, Response $^1/_1$, Speed 2 min/μ, Supression 1. *A* und *B* in Mikrozelle.

kannte *d*-1-Dehydro-cortison (VI)[11]. Razemisches, totalsynthetisches Östron (VII)[12] konnte nach einer vor längerer Zeit veröffentlichten Reduktionsmethode[13] mittels Presshefe in *d*-Östradiol-(17β) (VIII) und *l*-Östron übergeführt werden.

Die genannten experimentellen Ergebnisse sind auch in theoretischer Hinsicht interessant. Seit den klassischen Arbeiten von Pasteur war es zwar bekannt, dass Enzyme aus Mikroorganismen in stereospezifischer Weise auf razemische Substrate einwirken können, indem die beiden optischen Antipoden oft verschieden rasch umgesetzt werden[14]. Diese Umsetzungen stellten aber meist, wenn sie nicht einfache Hydrolysen oder Decarboxylierungen betrafen, einen völligen Abbau selektiv des einen Antipoden im mikrobiologischen Metabolismus dar. Dabei ging im allgemeinen gerade der erwünschte natürliche Antipode verloren, während der unnatürliche intakt blieb. Ausserdem musste der eine Antipode vollständig angegriffen werden, damit der andere in optisch reiner Form anfiel. Aus allen diesen Gründen fand die enzymatische Auftrennung von Razematen nur ausnahmsweise praktische Anwendung und ist bisher bei totalsynthetischen *d,l*-Steroiden nicht verwendet worden.

Der grosse Vorteil der neuen Methode zur mikrobiologischen Spaltung von razemischen Steroiden besteht nun darin, dass der natürliche *d*-Antipode nicht abgebaut, sondern zu einem an sich erwünschten Reaktionsprodukt umgewandelt wird[15]. Letzteres lässt sich im allgemeinen wegen seiner veränderten Polarität sehr leicht von der nicht umgesetzten *l*-Form des Ausgangsmaterials trennen. S lbst in den Fällen, wo keine völlige Umsetzung der *d*-Form erzielt wird, fällt diese als optisch reines Umwandlungsprodukt an. Nun sind aber heute schon einige mikrobiologische Reaktionen an Steroiden bekannt (vgl. [15]), die praktisch quantitative Umsetzungen in der *d*-Reihe ergeben. Damit lassen sich bei der neuen Razematspaltungsmethode nahezu theoretische Ausbeuten erzielen und können auch die *l*-Antipoden der Ausgangsstoffe in optisch reiner Form erhalten werden.

Bei der Totalsynthese von Steroiden kann mit dieser Methode die oft mühsame und verlustreiche chemische Razematspaltung umgangen werden. An ihre Stelle tritt zum Beispiel eine mikrobiologische Hydroxylierung, Dehydrierung oder Hydrierung geeigneter Zwischenprodukte, wobei neben der für die betreffende Synthese erwünschten Umwandlung Razematspaltung erzielt wird.

Experimentelle Einzelheiten dieser Untersuchung werden in Helvetica chimica Acta veröffentlicht.

Die in dieser Arbeit erwähnten Pilzstämme wurden uns von den Herren Prof. E. Gäumann und Dr. L. Ettlinger, ETH. Zürich, zur Verfügung gestellt, wofür wir auch an dieser Stelle verbindlichst danken möchten. Herrn Dr. E. Ganz, Physikalische Laboratorien der CIBA sind wir für die Aufnahme der IR.-Spektren zu Dank verpflichtet.

E. Vischer, J. Schmidlin und A. Wettstein

[11] H. L. Herzog und Mitarbeiter, Science *121*, 176 (1955). – E. Vischer, Ch. Meystre und A. Wettstein, Helv. chim. Acta *38*, 835 (1955). – A. Nobile und Mitarbeiter, J. Amer. chem. Soc. *77*, 4184 (1955). – Vgl. auch Note [9], S. 50.

[12] G. Anner und K. Miescher, Exper. *4*, 25 (1948); Helv. chim. Acta *31*, 2173 (1948).

[13] A. Wettstein, Helv. chim. Acta *22*, 250 (1939).

[14] Vgl. H. Brockmann in K. Freudenberg, *Stereochemie* (J. Deudicke, Leipzig und Wien 1933). – V. P. Whittacker in W. Klyne, *Progress in Stereochemistry* (Butterworth, London 1954).

[15] Die Reaktionsmechanismen der mikrobiologischen Umwandlung von Steroiden wurden kürzlich an dieser Stelle in Analogie zur heutigen Auffassung der enzymatischen Reaktionen diskutiert: A. Wettstein, Exper. *11*, 465 (1955).

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft Basel, Pharmazeutische Abteilung, den 13. September 1955.

Summary

A racemic intermediate in the total synthesis of *d,l*-aldosterone, the *d,l*-20-oxo-pregnene derivative I, was converted by incubation with a mold hydroxylating in the 21-position into the *d*-20-oxo-21-hydroxy-pregnene derivative II, whereas the *l*-antipode of the starting material remained unchanged. This stereospecific microbiological reaction, comprising a separation of racemic modifications, represents the last remaining step in the synthesis of natural *d*-aldosterone.

Other microbiological conversions of racemic steroids, dehydrogenation and hydrogenation, were also shown to proceed only with the *d*-enantiomer, leaving the *l*-form of the *d,l*-substrate intact.

The advantages of this new microbiological method for the resolution of racemic modifications during the total synthesis of steroids are discussed.

Extreme Chromosomal Polymorphism in a Coccinellid Beetle[1]

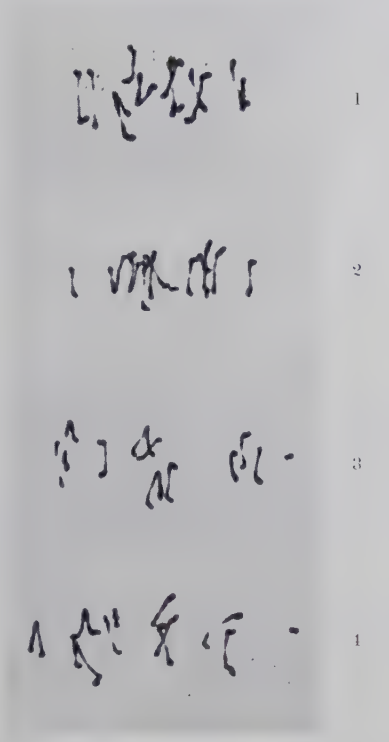
Chilocorus stigma Say, a North American predator of scale insects (probably *Chionaspis lintneri* Comst. in this instance), is a species not previously reported in the cytological literature. A single adult male, collected June 19, 1955, from the north shore of Lake Michigan, some 70 miles to the south of Sault Ste. Marie, Ontario, proved to be heterozygous for a "centric fusion" (White[2]): it has $2n = 26$ chromosomes — 11 bivalents, 1 trivalent, and a single X chromosome at the first meiotic metaphase. Further material was unavailable until 2 males were obtained on August 24, 1955, from near the Agawa River, about 100 miles north of Sault Ste. Marie. 1 has $2n = 25$ chromosomes — 9 bivalents, 2 trivalents, and the X chromosome (Figs. 1 and 2), the other $2n = 24$ — 7 bivalents, 3 trivalents, and the X (Figs. 3 and 4). Specimens collected since have all proved to be too old for cytological purposes.

It will be seen from the illustrations of the 24-chromosome male that the 3 trivalents are individually recognizable. If these are labelled *A*, *B*, and *C* from left to right in Figure 4, it is evident that trivalents *A* and *B* occur also in the one with 25 chromosomes. The *A* trivalent alone is present in the Lake Michigan male. It will also be noted that at least 2 of the bivalents accompanying the 3 trivalents are heteromorphic, their unassociated arms being of different sizes. Thus *C. stigma* comprises potentially 3^5 (= 243) chromosomally different types, or twice that number if the XX ♀: XO ♂ sex-determining mechanism is taken into account. Assuming that the "fusion" homozygotes are all viable, as indeed they must be unless the heterozygotes enjoy an immense selective advantage over the "non-fusion" types, the current evidence points to a numerical chromosome range for the species extending from $2n = 21$ (♂) to $2n = 28$ (♀).

[1] Contribution No. 258, Forest Biology Division, Science Service, Department of Agriculture, Ottawa, Canada.

[2] M. J. D. White, *Animal cytology and evolution* (University Press, Cambridge 1954), p. 66, 203.

No other coccinellid is known with a chromosome number in excess of $2n = 18 + Xy$, although several have lower numbers[3]. In view of (1) the presence of large



Figs. 1–4.—First meiotic metaphases in 2 males of *Chilocorus stigma*.

Figs. 1 and 2.—$9_{II} + 2_{III}$ (*A* and *B*) + *X*.
Fig. 3.—7_{II} (2 at right heteromorphic) + 3_{III} (from left to right *B*, *A*, and *C*) + *X*.
Fig. 4.—7_{II} (2 near centre heteromorphic) + 3_{III} (from left to right *A*, *B*, and *C*) + *X*.
Feulgen-light green squash preparations ca. × 750.

masses of heterochromatin visible in *C. stigma* at pachytene; (2) the high frequency at diplotene of ring bivalents that resolve into simple rods by metaphase; and (3) the fact that whole chromosome arms or parts thereof can be lost with impunity in the formation of "fusion" products and heteromorphic bivalents, respectively, it seems reasonably certain that a process of centromere misdivision, of the type known in the plant *Campanula*[4], followed by the accretion of heterochromatin in the acquisition of new arms must have been the means by which the putative $2n = 27/28$ prototype evolved. If this is so and since the basic chromosome formula of the Coccinellidae is most probably $18 = Xy$[5], it appears likely that individuals with 4 trivalents exist, thus extending the theoretical limit of the species downwards to 19 chromosomes. Furthermore, since the chromosomes of this species evidently have a strong predisposition to "fuse", the possibility is open for matings between individuals carrying different combinations of "fused" chromosomes to have given rise to ring complexes analogous to, but structurally different from, those known in several plant genera.

It is, of course, not inconceivable that a similar situation exist in *Gryllotalpa gryllotalpa* and that its baffling numerical differences, which White[2] was loath to attribute to "centric fusion" because of the metacentric nature of the chromosomes, might in fact also have arisen by dispensing with genetically inert arms at the time of "centric fusion".

Postscript. Since this note was sent to press, material from stock cultures of Californian origin, kindly donated by John J. Drea, Department of Biological Control, University of California, Albany, California, has proved the existence of one of the expected homozygous fusion types in the form of males with the lower diploid chromosome number of 22. At meiosis these are present as two ring bivalents, both homozygous for a centric fusion, and nine rod-shaped bivalents. Of particular interest is the absence of an independent X-chromosome in these stocks: it is fused with one of a pair of autosomes, thus forming a heteromorphic rod-bivalent and constituting a new, neo-*XY*, sex-determining mechanism (*AX*:*A*). This discovery of polymorphism among the sex chromosomes increases the potential number of chromosomally different types of both sexes from 2×3^5 to 5×3^5, or 1215, and further extends the range of diploid numbers downwards to a theoretical 18.

I shall be glad to correspond with people who anticipate being able to help extend the geographical range of future studies by supplying living males of this and related species.

S. G. Smith

Forest Insect Laboratory, Sault Ste. Marie, Ontario, Canada, November 17, 1955.

Zusammenfassung

Von drei ♂♂ von *Chilocorus stigma* wies ein Tier eine (A), eines zwei (A, B) und das dritte drei (A, B, C) zentrische Fusionen auf; *2n* war 26, 25 und 24. Beim ♂ mit $2n = 24$ sind mindestens zwei Bivalente heterozygot. Abgesehen vom Unterschied der Geschlechtschromosomen (XX♀:XO♂) sind daher 243 verschiedene chromosomale Typen möglich. *2n* wird von 21 (♂) zu 28 (♀) variieren. Weitere Fusionen bei den Chromosomen der heterozygoten Paare würden zu $2n = 19$ führen, während sich nach andern Fusions-Kombinationen Ringkomplexe bilden müssten.

La question des hétérochromosomes chez les Sauropsidés. I. Reptiles

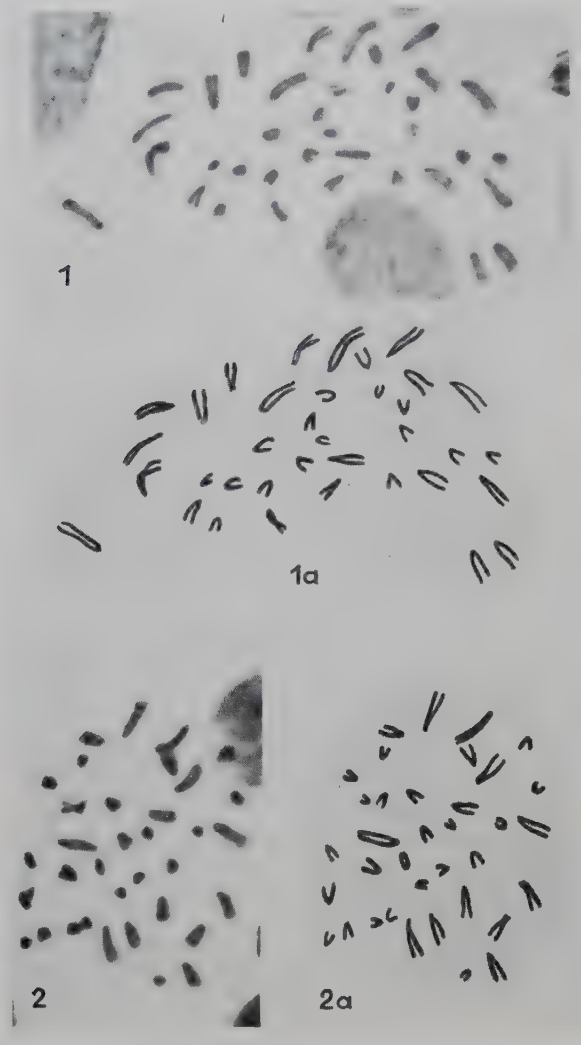
En 1934, Oguma[1], ayant constaté que le mâle de *Lacerta vivipara* possède 36 chromosomes et la femelle 35, admit l'existence d'une digamétie *Z-O* chez les Reptiles. En 1937, il[2] retrouve le même type chez une Tortue, *Amyda japonica* (♂: $2N = 64$; ♀: $2N = 63$). Makino et Asana[3] étudient deux Agamides avec les résultats suivants: *Calotes versicolor*: ♂: $2N = 12\,M + 22\,m$; ♀: $2N = 12\,M + 21\,m$. *Sitana ponticeriana*: ♂: $2N = 24\,M + 22\,m$; ♀: $2N = 24\,M + 21\,m$. (M = macrochromosomes, m = microchromosomes.) Nakamura[4] confirme l'existence d'un *Z-O* chez la femelle d'une Tortue, *Caretta caretta*, et, chez une autre Tortue, *Chelonia japonica*, Makino[5] compte 56 éléments chez le ♂, 55 chez la ♀. Et, dans le même travail, Makino note qu'il a réexaminé les préparations d'Oguma et qu'il est d'accord avec les conclusions de cet auteur.

D'autre part, Matthey[6] ne trouve aucune différence dans l'équipement chromosomique de *Chamaeleon vulgaris* qui, dans les deux sexes, possède $12\,M + 12\,m$. Margot[7] analyse les cinèses d'*Anguis fragilis* et de *Lacerta vivipara*: il y a $20\,M + 24\,m$ chez l'Orvet, 36 chromosomes chez le Lézard et il est impossible de mettre en

[3] S. G. Smith, Heredity *7*, 31 (1953).
[4] C. D. Darlington and L. F. La Cour, Heredity *4*, 217 (1950).
[5] S. G. Smith, Canad. Entom. *82*, 58 (1950).

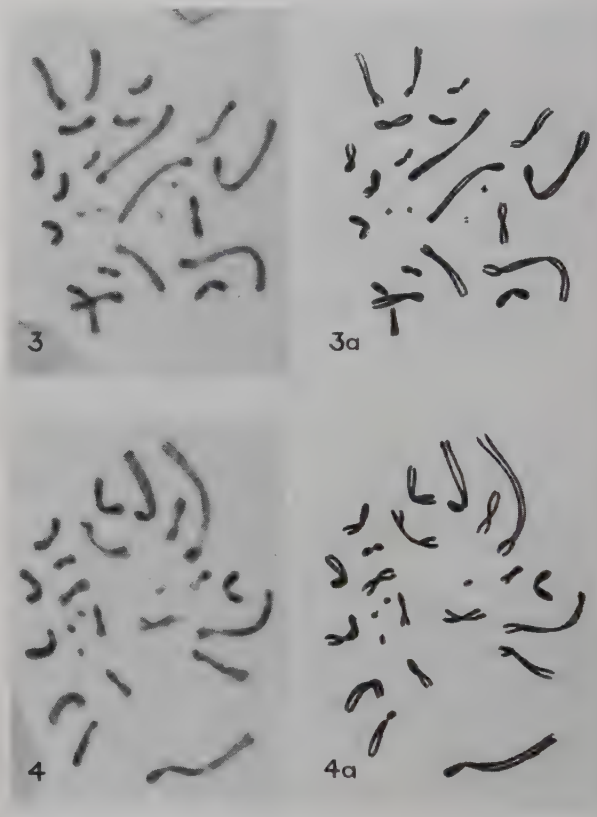
[1] K. Oguma, Arch. Biol. *45*, 27 (1934).
[2] K. Oguma, J. Genet. *34*, 247 (1937).
[3] S. Makino et J. Asana, Chromosoma *3*, 208 (1948).
[4] K. Nakamura, Kromosomo, *5–6*, 205 (1949).
[5] S. Makino, Annot. zool. Japon. *25*, 250 (1952).
[6] R. Matthey et J. Klaus, Arch. *18*, 1 (1943).
[7] A. Margot, Rev. suisse Zool. *28*, 555 (1946).

évidence une différence entre les deux sexes. Matthey[8] attache une signification particulière au cas du Caméléon, parce que, chez ce Saurien, les conditions chromosomiques sont si simples que toute erreur d'interprétation est exclue: il considère au contraire que lorsque les chromosomes sont très nombreux et que beaucoup d'entre eux sont très petits, l'évidence objective est inbeaucoup plus aisée, non que la fixation soit meilleure, mais parce que les figures sont beaucoup plus étalées. Nous avons alors repris le problème, nous attachant essentiellement: *a*) à élucider le cas de *Lacerta vivipara*; *b*) à découvrir un Reptile dont l'étude soit plus facile encore que celle du Caméléon vulgaire, de telle sorte qu'un lecteur puisse lui-même se former une opinion en examinant des microphotographies non retouchées. Ajoutons encore ceci: il est toujours difficile de trouver chez la femelle des mitoses nombreuses: or, J. van Brink a découvert que la rate, dans certaines conditions, livre en abondance des cinèses de qualité tout à fait comparable à celle des divisions spermatogoniales du mâle. Après avoir étudié plusieurs espèces de Caméléons, nous avons enfin découvert que le *Chamaeleon bitaeniatus* Fisch. répondait à toutes nos exigences.



Lacerta vivipara. Préparations obtenues par écrasement. Feulgen. × 1600.

Fig. 1. Microphotographie d'une mitose chez le ♂.
Fig. 1*a*. La même: dessin.
Fig. 2. Microphotographie d'une mitose chez la ♀.
Fig. 2*a*. La même: dessin.



Chamaeleon bitaeniatus. Préparations obtenues par écrasement. Feulgen. × 1600.

Fig. 3. Microphotographie d'une mitose chez le ♂.
Fig. 3*a*. La même: dessin.
Fig. 4. Microphotographie d'une mitose chez la ♀.
Fig. 4*a*. La même: dessin.

suffisante et que le rôle de l'interprétation personnelle devient excessif.

Tous les travaux que je viens de mentionner sont fondés sur des coupes obtenues à partir d'un matériel fixé par des liquides osmio-chromiques. Or, en ce qui concerne plus spécialement la numération des chromosomes, la technique des «squashes» prétraités à l'eau (Makino et Nishimura[9], Matthey[10]) rend la besogne

Lacerta vivipara: les Figures 1 et 1*a*, 2 et 2*a* montrent des cinèses empruntées, l'une au mâle, l'autre à la femelle: il est aisé de compter 36 chromosomes dans les deux cas. *Chamaeleon bitaeniatus:* les Figures 3 et 3*a*, 4 et 4*a* (♂ et ♀) permettent de dénombrer aisément les chromosomes et d'aboutir à la formule correcte, commune aux deux sexes: $2N = 20\,M + 4\,m$. Le petit nombre de microchromosomes autorise, puisque le décompte des grands éléments n'offre aucune difficulté, une conclusion absolument certaine et que nous estimons valable pour l'ensemble des Sauriens: il n'existe pas, dans ce groupe, de chromosomes sexuels à l'échelle morphologique.

[8] R. Matthey *Les chromosomes des Vertébrés* (F. Rouge, Lausanne 1949).
[9] S. Makino et I. Nishimura, Stain Techn. *27*, 1 (1952).
[10] R. Matthey, Rev. suisse Zool. *60*, 225 (1953).

N'ayant pas étudié de Chéloniens, il nous est évidemment impossible de nier *a priori* les affirmations des cytologistes japonais. Cependant, ceux-ci ayant commis une erreur dans le cas du Lézard vivipare, matériel relativement facile, il n'est pas exclu que chez les Tortues, dont le type cinétique est beaucoup plus complexe, ils se soient trompés dans le compte des microchromosomes. Une discussion à ce sujet trouvera place dans la seconde partie de nos recherches, consacrée aux Oiseaux.

R. Matthey et J. M. van Brink

Laboratoire de zoologie, Université de Lausanne et Institut de génétique, Université d'Utrecht, le 27 novembre 1955.

Summary

In contradiction to some Japanese authors (Oguma, Makino, Nakamura), we are unable to find any difference in the chromosome sets of the male and female of *Lacerta vivipara* ($2N = 36$). In a saurian, where the analysis is very easy (*Chamaeleon bitaeniatus*), there are, without the smallest doubt, 24 chromosomes in both sexes ($20M + 4\ m$). The evidence of a female heterogamety in turtles is by no means satisfying.

The Mitochondrial Pattern in the Development of the Ascidian Egg

(1)– Janus green has been, for a long time, considered a vital stain specific for the mitochondria. Recent investigations seem to have produced plausible evidence to explain such a specificity: the mitochondria are indeed supposed to be the seat of many enzymes, particularly the cytochrome-oxidase, with which Janus green chemically reacts.

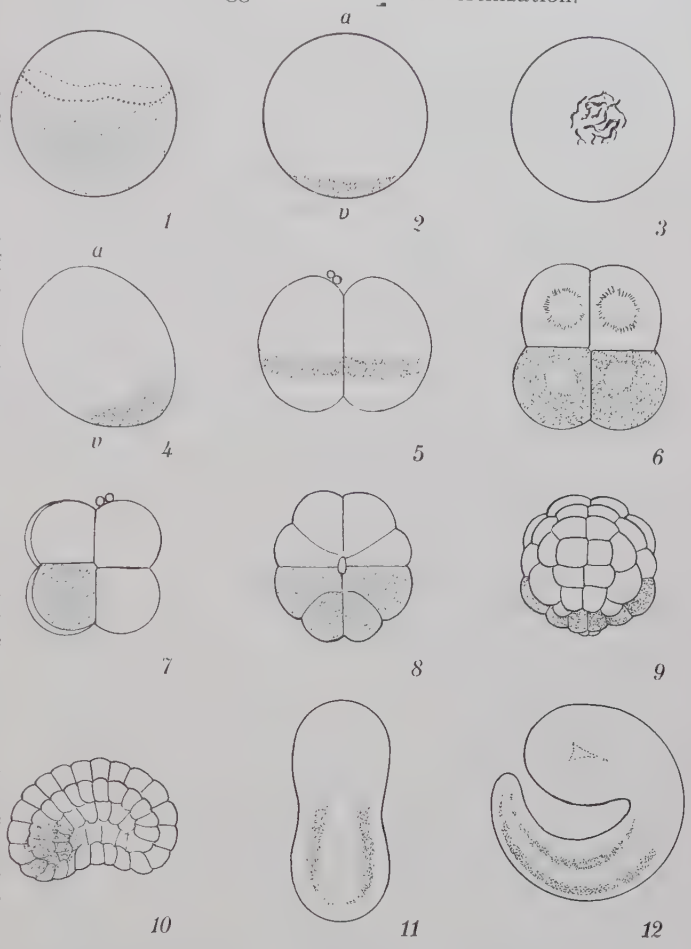
As Janus green in very diluted solutions is not toxic for the cell, it can be very profitably used to follow the modification and distribution of the mitochondria in the developing egg.

In the Ascidian egg, the distribution of mitochondria in specific cells during the embryonic development has been described by Duesberg[1]. Duesberg showed that the mitochondria of *Ciona* follow, in their distribution and segregation, the same pattern as the yellow pigment described by Conklin[2] in *Styela*.

Janus green has been used very little to study the differential distribution of mitochondria in different kinds of eggs or in the Ascidian egg itself. Only Child[3] recently used it in *Clavelina* egg, in the leucobase form after the reduction with sodium hydrosulfite, showing the existence of oxido-reduction gradients or peculiar oxido-reduction patterns.

The present work will be an introduction to more extensive research on the segregation of the mitochondria in the different cells of a developing embryo, and on the rôle of mitochondria in the processes of embryonic differentiation and induction.

(2)– *Phallusia mamillata* eggs were used as material for the present research. They are glass-clear, but an accurate observation reveals in the fertilized egg the yellow crescent, which was described by Conklin[2] in *Styela*. The *Phallusia* egg is therefore very suitable for treatment with vital dyes. The observation is greatly facilitated in eggs which have been deprived, mechanically or chemically, of their two membranes: the chorial one, with follicular cells, and the inner one, which is very thin and closely adhering to the egg; in the space between the two membranes there are numerous testal cells. Janus green colours the follicular cells purple, the testal cells blue and the egg green. Important differences are observed in the egg before and after fertilization.



Figs. 1–12.—Developing egg of *Phallusia*, after staining with Janus green (see the text). a = animal pole; v = vegetal pole.

The unfertilized egg possesses at the animal pole – which can thus be very easily determined – a small refringent spot, corresponding to the first metaphasic figure: the nuclear sap of the broken germinal vesicle is spread all over this animal zone. This zone does not take up any colour with Janus green: the rest of the egg, which contains vitelline granules and pigment granules is on the contrary coloured green. The two zones are very sharply separated by a circular line of intensively coloured granules or dots, which are situated subcortically (Fig. 1). The circular line is not even: it is rather sinuous, with slight differences in different eggs. An accurate search for evidence of the existence of a bilateral organization of the egg from the sinousity of the line did not give positive results. Child[3] was also unable to find evidence of such an organization with oxido-reduction indicators in the unfertilized *Clavelina* egg.

The aspect of the egg changes completely after the fertilization: the egg gradually becomes clearer, owing to a migration of the green particles towards the vegetal pole: the migration is very perceptible to the eye; it

[1] J. Duesberg, Bull. Acad. roy. Belgique *5*, 463 (1913).
[2] E. G. Conklin, J. Acad. nat. Sci. Philadelphia *13*, 1 (1905).
[3] C. M. Child, Physiol. Zool. *24*, 353 (1951).

would be very useful to analyse it by cinematography. As a consequence of such a migration, the vegetal pole becomes intensively green (Fig. 2). Observing the egg from the vegetal pole, one can distinguish a mass of intersecting green filaments (Fig. 3) which seem to be constituted by a peculiar aggregation of mitochondria.

Before the expulsion of the first polar body the spheric shape of the egg changes; the morphological modifications are continuous, especially at the vegetal pole, where a lobe appears, which makes the egg pyriform or oblongated. It reabsorbs rapidly after its appearance. It is difficult to say what is the meaning of such a lobe; it recalls the vitelline lobe of an egg of *Chaetopterus* or *Myzostoma*. What is important is that the lobe contains the whole green mass of mitochondria (Fig. 4). After the reabsorption of the lobe, the mass of mitochondria becomes located, no longer in the vegetal pole, but subequatorially. It looks like transverse green stripes, which are the equivalent of the yellow crescent of Conklin. The localization of the green mass is sharply subcortical.

The first plan of segmentation divides the transverse mitochondrial stripes into two parts and distributes each of them in a cell (Fig. 5); the second plan of segmentation segregates the green mass of mitochondria into the two posterior cells (Fig. 6); and the third one in the two vegetal posterior blastomeres (Fig. 7). It is well known that these blastomeres contain all the mesoplasm and a part of the endoplasm.

It would be deceptive to imagine that all the mitochondria of the egg are segregated only in the two posterior vegetal blastomeres of the 8-cell stage; in fact, sparse green granules can be perceived in the plasm of the other blastomeres. That is very evident in the stages which precede the segmentations, because at that time the mitochondria "orient" themselves in the form of astral rays around the clear area of the broken nuclei (*cf.* Fig. 6).

The segregation of the mitochondria in particular cells becomes stricter with the following segmentations (Fig. 8); gradually the mitochondria become segregated in the prospective muscle cells. The 64-cell stage shows an intense green coloration in the exterior ring of cells of the vegetal posterior part (Fig. 9), which is demonstrated by Ortolani[4] to give rise only to the muscle cells; the A7·6 cells, whose fate is not yet ascertained, do not stain. At the gastrula stage the vital coloration is limited to the lateral lips of the blastopore (Fig. 10); at the early tail-bud stage two lateral stripes in the posterior part of the embryo are coloured (Fig. 11), corresponding to the muscle cells. In the tadpole only the muscles result differentially coloured (Fig. 12).

It is of course possible to follow all these aspects described in the same egg, since diluted solutions of Janus green are not toxic for its development.

(3)—As indicated above, Child[3], using reduced Janus green, came to the conclusion that in the *Clavelina* egg there is an oxido-reduction pattern and a gradient whose maximum should be at the animal pole. Child did not seem to realize the meaning of such a pattern in the egg of Ascidians, because he did not relate it to the segregation of mitochondria and of the oxidative enzymes contained in them. In any case it must be said that there is no gradient in the uncleaved egg; the Figure 9 in Child's paper represents an egg before the fertilization, which was treated with oxido-reduction agents: Child was not able to give the orientation of the egg, but my observations show that the more densely dotted part of the egg corresponds to the vegetal pole, not to the animal one. On the other hand there is a perfect agreement between my observations and the Figures reported by Child: only they are not in favour of the existence of a gradient. That can be deduced also from Figure 10 of Child's paper, where a fertilized egg is represented, after treatment with the oxido-reduction agents: in the Figure, by my interpretation, the mitochondria are still migrating towards the vegetal pole, where they have already formed a mass. Here no question of the existence of a gradient can be raised.

(4)—What I have described above is the pattern of mitochondria along the development of *Phallusia*. This pattern is achieved by their gradual segregation along the lineage of the muscle cells. Muscle cells are related to the movement of the tail of the tadpoles, and every movement requires energy. The problem of energy is connected, although not exclusively, with some mitochondrial enzymes. In relation to the existence of oxidative enzymes in the mitochondria of the Ascidian egg, there are at present not many data. My research using some specific substances which block the activity of certain enzymes shows that in some mitochondria at least the cytochrome-oxidase, the succino-dehydrogenase and probably the benzidine-peroxidase are localized. The question of the existence of qualitatively different mitochondria, and the question of their qualitative segregation in different blastomeres, whose determination they possibly influence, is again raised by this research.

This idea was present in the minds of the early cytologists such as Meves[5], Regaud,[6] and Duesberg[1]. Let us recall what Duesberg wrote:

> « Je suis tenté d'admettre qu'il y a une répartition qualitativement inégale des plastosomes, et cette répartition qualitativement inégale me paraît devoir être le résultat d'une différentiation plus ou moins précoce des plastosomes... On peut dès lors se figurer avec Meves que dans les œufs doués d'un pouvoir régulateur, les plastosomes persistent pendant une partie du développement à l'état indifférent et donnent aux blastomères une potentialité totale, tandis que dans les œufs à mosaïque la différentiation se produit immédiatement après la fécondation, de telle sorte que chaque blastomère reçoive des matériaux différents.»

G. Reverberi

Zoological Institute, University of Palermo, November 6, 1955.

Riassunto

Con il verde Janus è stata seguita la distribuzione dei mitocondri lungo lo sviluppo dell'uovo di Ascidie. I mitocondri hanno una distribuzione diffusa nell'uovo vergine: ma dopo la fecondazione sono trasportati al polo vegetativo dell'uovo e successivamente nella porzione subequatoriale dorsale. Vengono poi gradualmente segregati nelle cellule della linea muscolare. Sono queste anche le cellule più ricche in citocromoossidasi, e che presentano un'attività ossido-riduttiva più intensa.

[4] G. Ortolani, Exper. *11*, 445 (1955).

[5] F. Meves, Arch. mikr. Anat. *82*, 215 (1913).

[6] Cl. Regaud (quoted by Meves).

Nachweis von individualspezifischen Gewebsantikörpern[1]

Gewebe und Organe können im allgemeinen bei Mensch, Hund oder Kaninchen nur autolog, das heisst auf dem gleichen Individuum transplantiert werden. Wird das Organtransplantat auf ein anderes Individuum der gleichen Spezies übertragen, so geht es nach einer gewissen Zeit zugrunde. MEDAWAR und Mitarbeiter konnten in ihren Untersuchungen über die homologe Transplantation von Haut bei Kaninchen beweisen, dass die erworbene Immunität bei der Zerstörung des homologen Hauttransplantates eine ausschlaggebende Rolle spielt (siehe Übersichtsreferat von MEDAWAR[2]). BILLINGHAM und SPARROW[3] konnten im Serum immunisierter Kaninchen das Vorhandensein von Immunkörpern nachweisen, die *in vitro* das Spendergewebe derart schädigen, dass eine autologe Transplantation solchen Gewebes nicht mehr möglich war. Eine direkte Antikörperbestimmung im Serum von Kaninchen mit homologen Gewebstransplantaten wurde bisher, soweit wir die Literatur überblicken, nie beschrieben. Hingegen fanden AMOS[4] und Mitarbeiter bei der Transplantation von Hautstücken unter Mäusen aus verschiedenartigen Inzuchtstämmen erworbene Iso-Hämagglutinine und Iso-Leukozytenagglutinine im Serum dieser Tiere.

Kürzlich beschrieben HOIGNÉ, GROSSMANN und STORCK[5] eine neue nephelometrische Methode zur Erfassung von Sensibilisierungen gegen medikamentöse, Inhalations- oder Nahrungsmittelallergene an Hand von Serum. Mit Hilfe des von diesen Autoren konstruierten Nephelometers konnten wir eine Reihe von Antikörpern nachweisen: Forssmann-Antikörper, species-spezifische Gewebsantikörper, individualspezifische Gewebsantikörper. Forssmann-Antikörper und spezies-spezifische Gewebsantikörper wurden schon mit den klassischen serologischen Methoden (Präzipitation, Komplementbindung usw.) nachgewiesen. In unserer Versuchsanordnung gelang es erstmals, durch eine diskrete Trübungsreaktion zwischen Serum und Organextrakten auch individualspezifische Gewebsantikörper, wie sie nach der Injektion oder Transplantation von homologem Gewebe entstehen, zu ermitteln. Diese Versuche werden im folgenden kurz wiedergegeben.

Methodik. 6 Kaninchen wurden mit Leberbrei, weitere 6 Tiere mit Nierenbrei von anderen Kaninchen einmalig subkutan injiziert. 6 Kaninchen wurden zellfreie Hautextrakte mehrmalig subkutan eingespritzt. 15 Kaninchen wurden Hautstücke von anderen Kaninchen ein- oder zweimalig orthotop transplantiert. Leber- oder Nierenbrei wurde auf folgende Weise hergestellt: 500 mg Leber oder Niere wurden ausgebluteten Kaninchen entnommen, fein zerschnitten und mit 5 cm³ physiologischer Kochsalzlösung im Potterapparat 2 min homogenisiert. Diese Organsuspension wurde Kaninchen einmalig subkutan injiziert. Die zur Injektion verwendeten zellfreien Hautextrakte wurden auf gleiche Weise wie die unten beschriebenen Antigenlösungen zubereitet und in täglichen Portionen von 5 cm³ injiziert. Zur Transplantation verwendeten wir je 2 kreisrunde Hautstücke von 5 cm Durchmesser.

Der Antikörpernachweis erfolgte mit der Methode von HOIGNÉ, GROSSMANN und STORCK[5]. Die Beschreibung des Nephelometers und dessen Bedienung ist aus der Publikation dieser Autoren zu ersehen. Die Antikörper wurden im Serum der sensibilisierten Tiere bestimmt. 0,5 cm³ Serum wurden mit 2 cm³ *Aqua destillata* vermischt und 1,9 cm³ dieser Verdünnung in ein Messgläschen des Nephelometers eingefüllt. Durch Zugabe von Antigenverdünnungen erfolgt beim Vorhandensein von Antikörpern eine Trübungsreaktion in einem bestimmten Verdünnungsbereich. Dies manifestiert sich durch eine fehlende weitere Aufhellung der Trübungsintensität nach der Zugabe von 0,1 cm³ der betreffenden Antigenverdünnung. Die Antigenverdünnungen wurden in einer Zweierreihe in *Aqua destillata* angelegt, wobei gewöhnlich mit einer Antigenverdünnung von 1:512 begonnen und mit unverdünntem Antigen geendet wurde.

Die Antigenlösungen, die wasserklar sein müssen, wurden folgendermassen hergestellt. 2 g eines Organs werden im Mörser feinst zerquetscht, mit 15 cm³ *Aqua destillata* versetzt und 1 h im Eisschrank bei + 4°C stehengelassen. Nach 10 min dauerndem Zentrifugieren bei einer Tourenzahl von 2750 U./min wird die überstehende Flüssigkeit abgegossen, der Rückstand mit 10 cm³ *Aqua destillata* aufgeschüttelt und wieder zentrifugiert. Das Auswaschen wird so oft wiederholt, bis die überstehende Flüssigkeit möglichst klar ist. Die zentrifugierten Gewebepartikel werden mit 12–15 cm³ *Aqua destillata* aufgeschüttelt und diese grobe Gewebssuspension in den Mixerapparat verbracht. Dieser dient der Desintegration der bisher noch intakten Zellen. Je nach Organ kann ein mehr oder weniger hoher Prozentsatz aller Zellen zertrümmert werden, so dass sich nachher die Zellinhalte in einer feinen Suspension befinden. Bei einer Tourenzahl der rotierenden Klingen von 12000 U./min wird Haut 20–45 min, Muskel 15–20 min und innere Organe wie Leber, Niere, Pankreas, Darm usw. 10 min im Mixerapparat belassen. Das Gemisch von feiner Suspension und groben Gewebspartikeln wird nachher auf 60 cm³ *Aqua destillata* verdünnt. Nach erneutem Zentrifugieren wird die überstehende Suspension durch ein Seitzfilter Nr. 3 filtriert. Das Filtrat ist wasserklar und wird im Deep freezer bei – 30°C aufbewahrt. Auch das Serum wird, falls nicht sofort verwendet, bei – 30°C aufbewahrt.

Resultate. Mittels der beschriebenen nephelometrischen Methode gelingt es nach Sensibilisierung mit homologem Gewebe, im Serum der sensibilisierten Tiere Trübungsreaktionen mit Extrakten des homologen Gewebes auszulösen. Alle mit Leber- oder Nierenbrei, mit Hauttransplantaten oder zellfreien Hautextrakten sensibilisierten Tiere zeigten eine positive serologische Reaktion mit der entsprechenden Antigenlösung des zur Sensibilisierung verwendeten homologen Gewebes.

Erworbener Antikörper, Dauer des Antikörpernachweises, Titer. Die Antikörper traten nach einmaliger Injektion von Gewebsbrei oder nach einmaliger Hauttransplantation frühestens nach 2 und spätestens nach 13, durchschnittlich nach 7 Tagen auf. Die serologische Reaktion wurde frühestens nach 7, spätestens nach 24, durchschnittlich nach 15 Tagen wieder negativ. Das Maximum des Antikörpertiters wurde zwischen dem 4. und 19. Tag, durchschnittlich am 10. Tag nach der Sensibilisierung erreicht, wobei die Titer bei unserer Versuchsanordnung zwischen 1:5 und 1:40 Serum-

[1] Die Arbeit wurde mit Hilfe des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung durchgeführt.

[2] P. B. MEDAWAR, *General Problems of Immunity* in: *Preservation and Transplantation of normal Tissues* (J. A. Churchill Ltd., London 1954).

[3] R. E. BILLINGHAM und E. M. SPARROW, J. exper. Biol. *31*, 16 (1954).

[4] D. B. AMOS, P. A. GORER, B. M. MIKULSKA, R. E. BILLINGHAM und E. M. SPARROW, Brit. J. exper. Pathol. *35*, 203 (1954).

[5] R. HOIGNÉ, W. GROSSMANN und H. STORCK, Schweiz. med. Wschr. 578 (1955).

verdünnung schwankten. Die mit täglichen Hautextraktinjektionen behandelten Tiere erhielten durchschnittlich 8 Injektionen bis zum Positivwerden der serologischen Reaktion.

Anamnestische Reaktion. Bei 8 transplantierten Kaninchen haben wir nach Negativwerden der Reaktion eine zweite Hauttransplantation durchgeführt. Während bei diesen Tieren nach der ersten Transplantation die durchschnittliche Dauer bis zum Auftreten der Antikörper 6½ Tage betrug, dauerte es nach der zweiten Transplantation durchschnittlich nur 2½ Tage, bis die serologische Reaktion positiv wurde. Bei 2 Tieren konnten schon am Tage nach der zweiten Transplantation Antikörper nachgewiesen werden.

Erworbener, nicht natürlicher, individualspezifischer Antikörper. Die Seren von 6 nichtsensibilisierten Kaninchen gaben mit Hautantigenlösungen von 15 verschiedenen Kaninchen niemals eine Trübungsreaktion. Mit grösster Wahrscheinlichkeit existieren also keine natürlichen Antikörper vom Typ der mit unserer Methode nachgewiesenen Antikörper. Ferner konnten wir im Serum von 10 sensibilisierten Kaninchen, die eine positive Reaktion mit den Gewebsantigenlösungen des sensibilisierenden Kaninchens zeigten, nie Antikörper gegen Gewebe von 10 anderen nicht zur Sensibilisierung verwendeten Kaninchen nachweisen. Aus diesen Versuchen geht hervor, dass der nachgewiesene Antikörper wahrscheinlich individualspezifisch ist. Es ist allerdings nicht mit Sicherheit auszuschliessen, ob nicht doch Fälle von gekreuzter Sensibilisierung vorkommen. Vielleicht besteht eine solche Vielfalt von Antigenen, dass wir bei unseren Versuchen zufällig nie 2 Kaninchen mit gemeinsamen Antigenen angetroffen haben.

Individualspezifisches, in sämtlichen Organen eines Individuums vorkommendes Antigen. Die nach Injektion von Gewebsbrei oder Gewebsextrakt, bzw. nach Hauttransplantation auftretenden Antikörper reagieren nicht nur mit demjenigen Gewebe, mit welchem sensibilisiert wurde, sondern mit sämtlichen übrigen Organen des Spendertieres. In unseren Versuchen erhielten wir positive serologische Reaktionen mit folgenden Organextrakten: Haut, Niere, Leber, Herz, Lunge, Darm, Hoden, Uterus, Pankreas, Muskel. Der von uns nachgewiesene Antikörper scheint mit einem individualspezifischen Antigen, das in sämtlichen Organen eines Individuums vorkommt, in Reaktion zu treten.

Absättigung. Nach Absättigung des Serums mit Gewebsextrakt werden die Trübungsreaktionen negativ. Der Antikörper kann mit jedem Organextrakt abgesättigt werden, sei es mit dem sensibilisierenden Organ oder auch mit einem anderen Organ desselben Spendertieres. Nach Absättigung fällt die Reaktion nicht nur mit dem zur Absättigung verwendeten Organextrakt, sondern auch mit allen anderen Organextrakten des betreffenden Spendertieres negativ aus.

Eigenschaften von Antikörper und Antigen. Der erwähnte Antikörper ist thermolabil. Bei Erhitzen des Serums auf 56°C wird er nach 10–15 min zerstört. Bei 37°C ist der Antikörper nach 1–5 h, bei Zimmertemperatur nach 12–48 h nicht mehr nachweisbar. Die Dialyse mittels Collodiummembran gegen Phosphatpuffer, *Aqua destillata* oder Normalserum während 8–24 h bei + 4°C zeigte, dass der Antikörper nicht dialysabel ist.

Das Antigen der Gewebsextrakte, mit dem der Antikörper in Reaktion tritt, wird bei Erhitzen auf 56°C nach 30–90 min zerstört. Bei 37°C ist das Antigen nach 10–24 h, bei Zimmertemperatur nach 1–2 Tagen nicht mehr nachweisbar. Häufiges Einfrieren auf – 30°C und Auftauen zerstört sowohl Antigen wie Antikörper.

W. Bollag

Medizinische Universitätsklinik Zürich, den 21. November 1955.

Summary

Injection of homologous tissue or tissue extracts and homologous transplantation of skin in rabbits provoke the production of antibodies. By means of a new nephelometric method, acquired antibodies against homologous tissue circulating in the serum were found. This tissue-antibody seems to be an individual-specific one, reacting with all organs of the donor. The antibody is thermolabile and not dialysable.

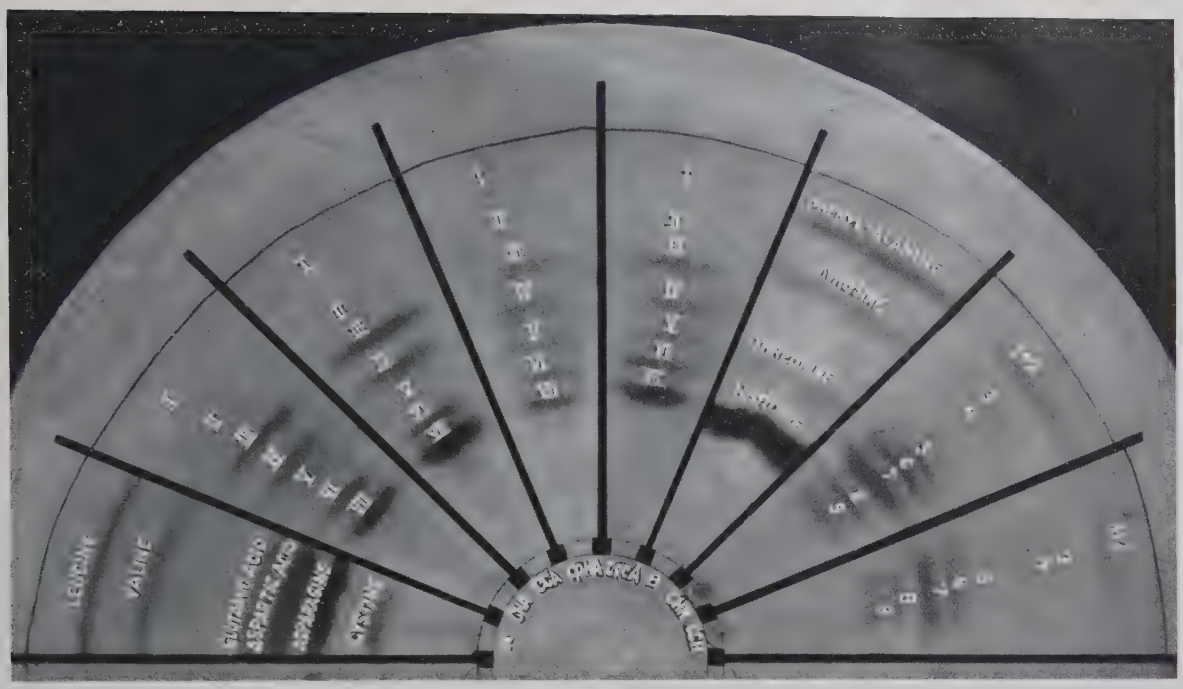
Increased Formation of Asparagine in 'Carica-curl' Virus Infected Leaves

A decrease in the content of insoluble leaf protein and a simultaneous increase in asparagine formation due to virus infection has been noted only in few cases. Recently authors have noticed asparagine formation in T.M.V. and Tobacco leaf-curl infected tobacco leaves[1], "yellow vein mosaic" infected leaves of *Abelmoschus esculentus*[2] and in mosaic infected leaves of *Carica papaya*[3]. The present study reveals an increased formation of asparagine and a ninhydrin reacting substance having Rf value 0·67 corresponding to β-alanine + α-aminobutyric acid due to 'Carica-curl' virus infection in *Carica papaya* leaves.

The healthy and 'Carica-curl' infected leaves were collected at about 9 a.m., from the fourth and fifth nodes, from the two shoots of the same plant, one of which was severely infected and the other healthy. The free amino acids were extracted by freezing the tissue and extracting with 70% alcohol in cold whereas the insoluble leaf protein was extracted by hydrolyzing the residue with 6*N* Hcl and autoclaved at 20 lbs. pressure for 15 min. The amino acids were assayed using Ranjan's *et al.*[4] horizontal migration multiple-sector technique of paper chromatography.

The free amino acids of both the leaf blade and the petiole of diseased and healthy leaves do not show any qualitative change, but the content of asparagine shows a remarkable increase in case of the 'carica-curl' infected leaves. The band corresponding to β-alanine + α-aminobutyric acid also shows an increase in the curl infected leaves as compared to healthy ones. The following free aminoacids were identified: leucines + phenylalanine (Rf 0·87; I), valine + methionine (Rf 0·74; II), β-alanine + α-aminobutyric acid (Rf 0·67; III—identified by its position *cf.* Radha Krishnan and Vaidyanathan[5]), alanine (Rf 0·57, IV), glutamic acid (Rf 0·50; V), aspartic acid (Rf 0·44, VI) and amide asparagine (Rf 0·36, VII). Band nos. I, II, and V were present in such low quantities as not to be detected in the photographs. The absence of threonine and glycine + serine, which give common bands with glutamic acid and aspartic acid respectively,

[1] M. M. Laloraya and Govindjee, Nature *175*, 907 (1955).
[2] Govindjee, M. M. Laloraya, and T. Rajarao (unpublished).
[3] M. M. Laloraya, Govindjee, R. Varma, and T. Rajarao (unpublished).
[4] S. Ranjan, Govindjee, and M. M. Laloraya, Proc. Nat. Inst. Sci. India, [B] *21*, No. 1, 42 (1955).
[5] A. N. Radha Krishnan and C. S. Vaidyanathan, Naturwissenschaften *41*, H. 18, 432 (1954).



Chromatogram showing amino acids of healthy and 'Carica-curl' infected leaves of *Carica papaya* (Solvent: But.-Acetic Acid-Water) 4 : 1 : 5

A and *D* – Reference solutions; *CHA* – Alcoholic extract of healthy leaves; *CCA* – Alcoholic extract of 'Carica-curl' infected leaves; *CpHA* – Alcoholic extract of healthy petiole; *CpCA* – Alcoholic extract of 'Carica curl' infected petiole; *CHH* – Acid hydrolysate of healthy leaves; *CCH* – Acid hydrolysate of 'Carica-curl' infected leaves.

was established by running the chromatogram with McFarren's technique[6].

The acid hydrolysate of both the healthy and 'carica-curl' infected leaves show the presence of the following common amino acids: leucines + phenylalanine (Rf 0·87; 1 and 2), valine + methionine (Rf 0·75; 3), tyrosine (Rf 0·73; 4), alanine (Rf 0·57; 5), glutamic acid + threonine (Rf 0·50; 6), glycine + aspartic acid (Rf 0·44; 7), arginine (Rf 0·38; 8) and histidine + lysine (Rf 0·32; 9). A decrease in the intensity of the bands is observed in the hydrolysate of 'carica-curl' infected leaves as compared to healthy leaves.

Such an increased formation of asparagine and β-alanine + α-aminobutyric acid may be either due to the breakdown of the insoluble leaf protein or through some other unknown metabolic process, induced by virus infection.

We are grateful to Prof. Shri Ranjan for his valuable guidance and interest in the work. We wish to thank Shri K. S. Bilgrami for his valuable help.

M. M. Laloraya, Govindjee, Rajni Varma, and T. Rajarao

Department of Botany, University of Allahabad, India, October 19, 1955.

Zusammenfassung

Mit Hilfe der Papierchromatographie wurden lösliche und unlösliche Proteine in gesunden und durch «Carica-Curl»-Virus erkrankten Blättern von Carica-Papaya bestimmt. In kranken Blättern nehmen die unlöslichen Proteine ab, der Gehalt an Asparagin, β-Alanin + α-Aminobuttersäure zu, was wohl auf eine Änderung des Eiweißstoffwechsels der infizierten Blätter unter dem Einfluss des Virus zurückgeführt werden darf.

[6] Earl F. McFarren, Anal. Chem. *23*, 168 (1951).

Sur l'interaction entre aldéhydes ou réductones et acides aminés ou protéines

IV. Dosages des groupements basiques des protéines traitées à l'acétaldéhyde ou au glucose

Les propriétés physicochimiques des protéines subissant la réaction de Maillard (brunissement non-enzymatique des protéines en présence de sucres réducteurs), changent d'une façon progressive au cours de la réaction. Leur poids moléculaire augmente, la solubilité diminue, la polydispersion du produit s'accentue, ce qui peut être mis en évidence par l'électrophorèse et ultracentrifugation[1]. En dehors de son importance bromatologique, cette réaction mérite l'intérêt des biochimistes, car il n'est pas impossible que la combinaison *in vivo* du glucose (ou d'autres substances de nature aldéhydique) et des groupements basiques des protéines sériques et tissulaires joue un rôle physiologique. L'étude d'un tel problème nécessite avant tout une méthode permettant de suivre les modifications des protéines. La modification primaire des protéines étant le blocage de ses groupements basiques, nous avons essayé d'appliquer la méthode de Fraenkel-Conrat et Cooper[2] au dosage des groupements basiques des protéines avant et après traitement à l'acétaldéhyde ou au glucose[3].

Le Tableau suivant donne les résultats de ces dosages.

[1] A. Mohammed, H Fraenkel-Conrat et H. S. Olcott, Arch. Biochem. *24*, 157 (1949). – L. Robert et F. S. Penaranda, J. Polymer. Sci. *12*, 337 (1954). – M. Polonovski et L. Robert, Exper. Med. Surg. *12*, 68 (1954).

[2] H. Fraenkel-Conrat et M. Cooper, J. biol. Chem. *154*, 239 (1944).

[3] Cette méthode consiste en la mesure spectrophotométrique de la combinaison entre les protéines et un colorant acide (orange G) à pH 2,0, la quantité de colorant fixé étant fonction du nombre des groupements basiques.

Dosage des groupements basiques des protéines avant et après traitement au glucose ou à l'acétaldéhyde

Protéine	Groupements basiques en $\frac{\text{équivalent g}}{10^4 \text{ g protéine}}$			Rapport C/N dans la protéine	
	Valeur théorique[1]	aleur trouvé pour la protéine		avant traitement	après traitement
		avant traitement	après traitement		
Sérum albumine de cheval	13,8–14,3	11,5	5,88[2]		
Sérum humain[3]		12,3			
		11,9	12,1[4]		
		11,7			
Sérum-albumine de bœuf		16,85	14,36[5]	2,96	3,79
Caséine[6]	7,6– 9,4	8,06	8,88[5]	3,46	3,29
Gélatine	8,9–10,7	10,15	9,98[5]	2,69	
Fibrine	13,0	14,44	14,46[5]	3,04	3,03
Edestine	12,8–14,1	17,8		2,60	2,50
Elastine[7]	0,77–1,08	0,5	0,29[5]	3,23	3,22

[1] Chiffres extrêmes obtenus par différents auteurs et par des méthodes diverses [E. J. Cohn et J. T. Edsall, *Proteins, Amino-acids and Peptides* (Reinhold Publ., 1943), p. 354].

[2] Incubation de la protéine (solution aqueuse 5 par 100) avec une solution de glucose 1 *M* (2 moles par équivalent de groupement basique), à 38° pendant 2 jours.

[3] Les valeurs pour le sérum sont exprimées en *m Eq.* de groupement basique pour 100 ml de sérum.

[4] 3 ml de sérum sont incubés avec 0,3 ml de glucose à 43% pendant 24 h à 37° (~ 2 moles de glucose par équivalent de groupement basique).

[5] Sérum-albumine, caséine, gélatine, fibrine, édestine, et élastine sont exposées à état sec à des vapeurs d'acétaldéhyde, sous une cloche à 18–20°, à une humidité relative de 65–70%, pendant 10 jours, puis séchées sous vide phosphorique et par la méthode thermogravimétrique [C. Duval et L. Robert, C. r. Acad. Sci. *238*, 282 (1954)].

[6] Caséine de Merck, purifiée selon Hammarsten.

[7] L'élastine est préparée à partir de média d'aorte de bœuf selon la méthode de I. Banga, Acta physiol. Hungar. *3*, 317 (1952).

On voit qu'en dehors de la sérum-albumine et de l'élastine, la teneur apparente en groupements basiques des protéines n'est pas diminuée au cours de la réaction, bien que dans le cas de l'acétaldéhyde la formation de résines aldéhydiques soit abondante avec toutes les protéines. Ces constatations sont en accord avec les résultats de Strain[4], qui ne trouve pas de diminution des groupements basiques pour l'alanine traitée ou non au glucose, en employant la méthode titrimétrique de Linderström-Lang[5]. Ceci s'explique si on admet que la glucosylamine initialement formée, donne naissance au cours de la réaction à des bases secondaires ou tertiaires, dont le pK est assez élevé pour être titré par le colorant à pH 2,0, où on opère.

Le comportement exceptionnel de la sérum-albumine, confirmé par les dosages élémentaires (rapport C/N augmenté) et le dosage de la résine aldéhydique formée sur la protéine[6], démontre une fois de plus la réactivité particulière de cette protéine, qui forme facilement des complexes avec des anions, des cations et des molécules non chargées. La combinaison du glucose avec la sérum-albumine est lente, en comparaison avec la réactivité du glucose avec les acides aminés qu'on peut suivre par titrimétrie selon la méthode de Katchalsky et Scharon[7]. Kepes n'a pas trouvé de combinaison entre glucose et sérum-albumine dans les premières heures de contact, par la méthode de dialyse de Klotz[8]. La dénaturation préalable des protéines ne semble pas accélérer la combinaison. Ceci a été démontré par l'application de la méthode de Katchalsky à des mélanges sérum-glucose: on mesure l'abaissement de pH au cours de la réaction, cet abaissement étant proportionnel à la combinaison du glucose avec les groupements basiques des protéines. Le titrage continu de ces mélanges n'a pas été pratiquable à cause de la lenteur de la réaction.

La variation du pH d'un sérum humain normal incubé 2 jours à 37° sous toluène avec du glucose (4 *mM* pour 2 ml de sérum) est de $-2{,}27$ unités (contrôle sans glucose $+0{,}23$); le même sérum dénaturé par 0,4 g d'urée donne une variation de pH de $-2{,}24$ (contrôle sans glucose $+0{,}55$), en présence de 1 mg de zéphirol le pH variant de $-1{,}99$ unités (contrôle sans glucose $+0{,}02$). Signalons enfin la constance de la teneur en groupements basiques protéidiques des sérums examinés, propriété qui a été mise à profit par Courtois et Barré[9] pour l'utilisation du dosage des groupements basiques des protéines sériques en clinique. Des variations importantes sont obtenues au cours de certaines maladies.

Vera Bajic, L. Robert et
J. Polonovski

Service de Chimie, Faculté de Médecine, Paris, le 28 septembre 1955.

Summary

Proteins were exposed to acetaldehyde vapour or mixed with glucose in solution and the basic groups determined by their dy binding capacity. Only serum albumin shows a marked decrease of basic groups and of the carbon/nitrogen ratio as a sign of condensation of aldehyde and amine groups. These results were corroborated by the direct estimation of the aldehyde resine formed on the protein: serum albumin and fibrin treated with acetaldehyde vapour contained 5 to 10 times more resin than the other proteins examined. No rapid combination between serum proteins and glucose could be demonstrated by the dy method or by the kinetics of change of pH. The slow reaction seems not to be dependent on denaturation.

[4] G. Johansen et W. J. Nickerson, Res. Com. 1er Congr. Int. Bioch. Cambridge 1949, p. 223.

[5] H. H. Strain, C. r. Lab. Carlsberg Ser. Chim. *23*, 159 (1940).

[6] L. Robert et V. Bajic (en préparation).

[7] A. Katchalsky et N. Scharon, Biochim. biophys. Acta *10*, 290 (1953).

[8] A. Kepes (communication personnelle).

[9] J. Courtois et R. Bassé, Bull. Soc. Chim. biol. (1955) (sous presse).

Wirkung eines tumorhemmenden Stoffes, des Triäthylenmelamins, auf das Wachstum von Fremdkörpergranulom und Tumor

Für die Beurteilung der Spezifität chemotherapeutischer Hemmungen des Tumorwachstums ist die Bestimmung der Wirkung an bösartigem und schnell wachsendem nicht bösartigem Gewebe Voraussetzung. Hierfür ist der Vergleich der Wirkung am Fremdkörpergranulom nach MEIER, SCHULER und DESAULLES[1] und an Tumoren geeignet. Als tumorhemmender Stoff wurde Triäthylenmelamin gewählt. Die Versuche wurden unter vergleichbaren Bedingungen (Dosierung, Applikationsart, Versuchsdauer) durchgeführt.

Methodik

a) Wirkung am Granulom. Für die Granulomversuche wurden männliche Albinoratten mit einem Anfangsgewicht von 100 bis 120 g verwendet. Die Nahrung bestand aus vollwertigem Rattenkuchen (Allied Mills Chicago) und Wasser *ad libitum*. Die Tiere wurden in Metall- oder Plastikkäfigen bei konstanter Lufttemperatur und relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Den Ratten wurden am ersten Versuchstag dorsal zwei sterile, 50 mg schwere Rohwattepresslinge subkutan unter leichtem Ätherrausch (Wundschliessung durch Jodkollodium) implantiert. Während des ganzen Versuchs wurden täglich Gewichtskontrollen vorgenommen. 7 Tage nach Versuchsbeginn wurden entstandene Granulome herauspräpariert und gewogen. Triäthylenmelamin wurde, wie in Tabelle I angegeben, während 6 Tagen nacheinander täglich appliziert. Das Präparat wurde jeweils kurz vor Gebrauch in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und sofort den verschiedenen Tiergruppen verabreicht.

b) Wirkung an Tumoren. Männlichen 100–120 g schweren Shermanratten wurden in Gruppen von je 6–10 Tieren 3–5 Tage vor der ersten Applikation des Präparates in der rechten Achselhöhle wenige Kubikmillimeter des Walker-Carcinosarcoms 256, des Uterusepithelioms T-8 Guérin und des Flexner-Joblin-Carcinoms unter sterilen Kautelen subkutan implantiert. Die Tiere wurden unter gleichen Bedingungen wie die «Granulomratten» gehalten und wie in Tabelle II angegeben behandelt. Zwei Tage nach der letzten Applikation wurden zwei zueinander senkrechte Tumordurchmesser *in situ* gemessen.

Versuchsergebnisse

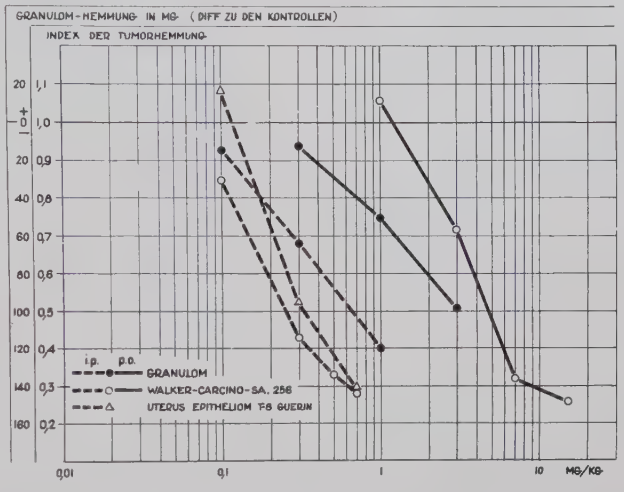
Die absoluten Hemmungswerte des Effektes von Triäthylenmelamin auf das Wachstum des Granuloms und dreier überimpfbarer Rattentumoren unter Angabe der Streuung wurden in Tabelle I und II dargestellt.

Um die Wirkung auf das Wachstum des Granuloms und der Tumoren zu vergleichen, wurde der Index der Tumorhemmung ermittelt (Abb. 1). Ein Indexwert von 1,0 bedeutet, dass der behandelte Tumor gleich gross ist wie der entsprechende Kontrolltumor; ein solcher von 0,5 entspricht der ED_{50}.

Eine absolute Hemmung des Granulomgewichtes von 100 mg im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen entspricht der ED_{50}. Auf dieser Basis ist es möglich, die Wirkung von Triäthylenmelamin auf das Wachstum des Granuloms und der Tumoren miteinander graphisch zu vergleichen.

[1] R. MEIER, W. SCHULER und P. DESAULLES, Exper. *6*, 469 (1950). – P. DESAULLES, W. SCHULER und R. MEIER, Exper. *7*, 188 (1951).

Aus den Tabellen geht hervor, dass nach intraperitonealer Applikation (für das Granulom allein auch nach subkutaner Applikation) Triäthylenmelamin von 0,3 mg/kg an das Wachstum des Granuloms, des Walker-Carcinosarcoms 256 und des Uterusepithelioms T-8 Guérin signifikant hemmt. Das Wachstum des Flexner-Joblin-Carcinoms wird nur angedeutet gehemmt. Die Stärke der Hemmung ist dosisabhängig. Die Beziehung der Wirkung zur Dosis dürfte für Granulom- und Tumorwachstum ähnlich sein.



Index der Tumorhemmung im Vergleich zur Hemmung des Granulomwachstums, das in mg als Differenz zu den entsprechenden Kontrollen angegeben ist. Index von 0,5 und —100 mg Granulomgewicht = ED_{50}.

Bei peroraler Applikation wird das Granulomwachstum von 1 mg/kg an, dasjenige des Walker-Carcinosarcoms 256 erst von Dosen von 7 mg/kg an, signifikant gehemmt. Uterusepitheliom T-8 Guérin und Flexner-Joblin-Carcinom werden in ihrem Wachstum nicht signifikant beeinflusst. Die Intensität der Wachstumshemmung ist auch nach peroraler Applikation dosisabhängig und verläuft für das Granulom und das Walker-Carcinosarcom 256 annähernd parallel.

Alle Dosen, die das Wachstum des Granuloms oder der Tumoren beeinträchtigen, hemmen auch die normale Körpergewichtszunahme (siehe Tabelle I und II).

Alle Unterschiede der beiden «Gewebeneubildungen» hinsichtlich Mechanismus, Zusammensetzung, Wachstumsverlauf sollten den Versuch einer gemeinsamen Interpretation der Hemmungsphänomene nicht ausschliessen, da jedenfalls in beiden Fällen ein Teil des untersuchten Vorganges die rasche Zunahme einer Zellmasse darstellt.

Grundsätzlich ergeben sich folgende Möglichkeiten der Deutung:

1. Der Hemmeffekt greift in beiden Fällen an einem gleichartigen spezifischen Substrat an.
2. Der spezifische Effekt ist am Tumor von der Wirkung am Granulom in seinem Mechanismus verschieden.
3. Es greift in beiden Fällen ein Teil des Hemmeffektes oder im Falle des Granuloms der gesamte Hemmeffekt an einem allgemein gewebewachstumsanregenden Faktor, der auch für die Tumorentwicklung von Bedeutung ist, an.

Unabhängig davon, welche Deutung letztendlich zutrifft, ergeben die Befunde, dass für die Wirkung des

Tabelle I

Dosis in mg/kg	Perorale Behandlung					Subkutane Behandlung					Intraperitoneale Behandlung				
	Tierzahl	Gewichtszunahme in g		Granulomgewicht in mg		Tierzahl	Gewichtszunahme in g		Granulomgewicht in mg		Tierzahl	Gewichtszunahme in g		Granulomgewicht in mg	
		absolut	Diff.	absolut	Diff.		absolut	Diff.	absolut	Diff.		absolut	Diff.	absolut	Diff.
Kontrollen 6 × 0,1 cm³ physiol. NaCl	16	26		420 ± 26,8		8	18		414 ± 24		8	20		422 ± 24	
6 × 0,1						7	4	−14	397 ± 22	−17	8	5	−15	403 ± 20,6	−19
6 × 0,3	8	20	− 6	404 ± 22,3	−16	6	0	−18	358 ± 19,4	−56	6	− 1	−21	355 ± 23,1	−65
6 × 1,0	14	14	−12	371 ± 17,4	−49	4	−20	−38	304 ± 17,2	−110	8	−14	−34	302 ± 19,6	−120
6 × 3,0	12	12	−14	322 ± 18,6	−98										

Tabelle II

Dosis in mg/kg	Walker-Carcinosarcom 256					Uterusepitheliom T-8 Guérin					Flexner-Joblin-Carcinom				
	Tierzahl	Gewichtszunahme in g		Tumordurchmesser in mm		Tierzahl	Gewichtszunahme in g		Tumordurchmesser in mm		Tierzahl	Gewichtszunahme in g		Tumordurchmesser in mm	
		absolut	Diff.	absolut	Diff.		absolut	Diff.	absolut	Diff.		absolut	Diff.	absolut	Diff.
Kontrollen intraperitoneal	58	+22		26,1 ± 8,6		14	+39		18,1 ± 4,3		18	+30		14,7 ± 6,9	
6 × 0,07											6	+25	− 5	8,8 ± 2,2	−5,9
6 × 0,1	8	+20	− 2	22,2 ± 7,8	− 3,9	6	+16	−23	19,8 ± 5,3	+ 1,7	6	+20	−10	8,1 ± 1,6	−6,6
6 × 0,3	44	− 3	−25	11,1 ± 4,0	−15,0	6	− 9	−48	9,6 ± 2,1	− 8,5	18	− 4	−34	5,8 ± 2,5	−8,9
6 × 0,5	44	−18	−40	8,5 ± 4,6	−17,6						6	−35	−65	5,3 ± 5,4	−9,4
6 × 0,7	45	−35	−57	7,2 ± 3,4	−18,9	14	−28	−67	5,4 ± 2,3	−12,7					
Kontrollen peroral	18	+36		32,5 ± 9,5		14	+39		18,1 ± 4,3		12	+28		14,6 ± 6,6	
6 × 1,0	10	+30	− 6	34,4 ± 10,7	+ 1,9										
6 × 3,0	18	+21	−15	23,4 ± 6,1	− 9,1						12	+21	− 7	9,3 ± 7,0	−5,3
6 × 7,0	7	+21	−15	10,5 ± 3,6	−22,0	14	+22	−17	18,2 ± 4,4	+ 0,1	6	+31	+ 3	6,8 ± 5,5	−7,8
6 × 10,0						6	+11	−28	15,6 ± 7,4	− 2,5	6	+21	− 7	5,1 ± 7,7	−9,5
6 × 15,0	8	−16	−52	8,6 ± 2,9	−23,9	8	− 6	−45	9,0 ± 5,1	− 9,1					

geprüften tumorhemmenden Stoffes Faktoren wichtig sind, die nicht tumorspezifisch sein können.

Es ist deshalb die Bedeutung allgemeiner Gewebewirkungen und Gewebewachstumsfaktoren für die Wirkung von tumorhemmenden Stoffen näher abzuklären. Wir werden auf analoge Befunde mit anderen tumorhemmenden Stoffen zurückkommen.

R. Meier, P. A. Desaulles und P. Loustalot

Wissenschaftliche Laboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, den 15. Dezember 1955.

Summary

The action of Triethylenmelamine, an anti-tumour substance, was investigated on tumourgrowth and on development of the foreign body granuloma comparatively.

It was found that this substance induces in both cases a similar dosis-dependent inhibition of growth.

As the inhibiting action of Triethylenmelamine can even be demonstrated on rapidly growing normal tissues, it is questionable whether the antagonistic action against tumour can be designed as tumour-specific.

Observations on the 5-Hydroxytryptamine (Enteramine) Release Caused by Reserpine in the Rat

Shore *et al.*[1] and Pletscher *et al.*[2] have recently shown that reserpine given intraperitoneally causes in the dog a marked increase in the rate of urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid-like material (5-HIAA), and in the rabbit a conspicuous, progressive reduction in the 5-hydroxytryptamine (5-HT) content of the gastrointestinal tract.

The experiments described in this preliminary communication confirm and extend the findings of the above investigators.

(a) 14 groups of 4 rats each, weighing 130–200 g, were injected intraperitoneally with distilled water (controls) or with 5 mg/kg reserpine. The animals were killed by decapitation at varying intervals after the injection and acetone extracts of serum, gastrointestinal tract, spleen and brain were prepared according to our usual procedure[3]. The 5-HT content of this material was assayed on the rat uterus preparation[4].

3 groups of 4 rats each were injected intraperitoneally with 1 mg, 0·3 mg and 0·1 mg/kg of reserpine, respectively, and killed after 16 h. The material was treated and studied as above.

The results are shown in Table I.

Table I

Treatment and time of survival	5-HT content, in µg of free base, per g of fresh material			
	Serum	Spleen	Gastro-intest. tract	Brain*
Distilled water 6 h . . .	0·60	1·61	2·07	0·23
Distilled water 40 h . . .	0·65	1·71	2·15	0·28
Reserpine 5 mg 1 h . . .	0·43	2·15	1·50	0·16
Reserpine 5 mg 2 h . . .	0·19	1·03	2·02	0·10
Reserpine 5 mg 4 h . . .	0·07	0·57	1·59	0·18
Reserpine 5 mg 6 h . . .	0·06	0·27	1·30	0·16
Reserpine 5 mg 10 h . . .	0·03	0·15	1·59	0·13
Reserpine 5 mg 20 h . . .	0·02	0·09	1·60	0·20
Reserpine 5 mg 40 h . . .	0·06	0·13	1·50	0·12
Reserpine 5 mg 3 days . . .	0·12	0·38	1·38	0·30
Reserpine 5 mg 4 days . . .	0·19	0·53	2·02	0·40
Reserpine 5 mg 6 days . . .	0·34	0·86	1·42	0·32
Reserpine 1 mg 16 h . . .	0·05	0·12	1·42	0·22
Reserpine 0·3 mg 16 h . . .	0·17	0·58	2·15	0·30
Reserpine 0·1 mg 16 h . . .	0·38	1·03	1·45	0·40

* The data concerning the brain have been obtained by P. Correale (forthcoming publication).

Two interesting facts emerge from the tabulated data: the first is that the decrease in the 5-HT content of serum (= blood platelets) and spleen is much more conspicuous, and considerably more durable than that in the 5-HT content of the gastrointestinal tract and brain; the second that a single dose of 0·1 mg/kg of reserpine is sufficient to cause the release of more than 30% of the normal 5-HT from the platelets and the spleen.

(b) To investigate whether exogenous 5-HT is capable of preventing the 5-HT release caused by reserpine, a high dose of 5-HT was given subcutaneously to 3 groups of 4 rats each, contemporaneously with an intraperitoneal dose of 2 mg, 1 mg, and 0·5 mg/kg of reserpine, respectively. All the animals of the group treated with 2 mg of reserpine died after 8–14 h; the others were killed after 24 h.

The results are summarized in Table II.

Table II

Treatment	5-HT content (µg/g)			
	Serum	Spleen	Gastro-intest. tract	Brain
Distilled water	0·68	1·42	2·30	0·44
Reserpine 1 mg + 5-HT 25 mg	0·57	2·58	1·96	0·20
Reserpine 0·5 mg + 5-HT 25 mg	0·74	3·62	2·25	0·40
5-HT 25 mg	1·23	2·65	–	–

It appears evident that pretreatment with massive doses of exogenous 5-HT is capable of maintaining high 5-HT levels especially in serum and spleen, in spite of the simultaneous administration of doses of reserpine which are very effective in reducing these levels. Further experiments are needed to elucidate the mechanism of this apparent competition between reserpine and 5-HT.

(c) 5 groups of 16 rats each, weighing 200–400 g, were distributed into 20 diuresis cages. After normal urine had been collected over a 3 h control period, 4 groups of rats were injected intraperitoneally with 5 mg/kg of reserpine and 1 group with distilled water (0·5 ml/100 g). Urine collection was then continued for 4 successive periods, each of 3 h. The 5-HIAA content of the different urine

[1] P. A. Shore, S. L. Silver, and B. B. Brodie, Science *122*, 284 (1955).

[2] A. Pletscher, P. A. Shore, and B. B. Brodie, Science *122*, 374 (1955).

[3] V. Erspamer, Arch. exper. Pathol. u. Pharmakol. *196*, 343 (1940); J. Physiol. (in press).

[4] V. Erspamer, Arch. exper. Pathol. u. Pharmakol. *196*, 343 (1940); J. Physiol. (in press).; Rendiconti scient. Farmitalia *1*, 1 (1954).

Table III

Treatment	5-HIAA content of urine (in μg per kg body weight)				
	Control period	Collection periods after treatment			
		0–3 h	3–6 h	6–9 h	9–12 h
Distilled water . .	10	13	12	13	10
Reserpine	11	20	58	20	12
Reserpine	14	20	50	20	13
Reserpine	10	20	54	40	10
Reserpine	13	18	52	32	12

samples was determined according the method described in a previous paper[5].

The results are shown in Table III.

It is easy to see from the tabulated data that the maximum excretion of 5-HIAA occurs in the second collection period, in which the urine content of the metabolite is more than fourfold, as compared with that of urine of untreated rats. The total 5-HIAA excreted by rats injected with reserpine exceeds that of control rats by 55–76 μg/kg.

(d) 2 groups of 4 rats each were injected subcutaneously with 25 mg/kg of 5-HIAA and killed after 30 min and 2 h respectively; 4 groups of 4 rats each were treated intraperitoneally with 1 mg and 5 mg/kg of 2-brom-*d*-lysergic acid diethylamide, coded *BOL* 148, and killed after 1 and 2 h, respectively; 3 groups of 5 rats each were given intraperitoneally daily injections of 10 mg/kg dibenamine and killed 8 h after the 1st, the 3rd and the 11th injection, respectively; finally, 4 groups of 4 rats each were given intraperitoneally chlorpromazine 2 and 10 mg/kg and killed after 5 and 24 h, respectively.

No significant changes in the 5-HT content of serum, spleen and gastrointestinal tract could be observed in these groups of animals.

The experimental results described in this communication will be discussed in detail in the paper *in extenso*.

I wish to thank the Sandoz and CIBA Research Laboratories, Basle, for generous samples of *BOL* 148 and reserpine (Serpasil), respectively. 5-HT creatinine sulphate and 5-HIAA were synthetized in the Farmitalia Research Laboratories, Milan.

V. Erspamer

Institute of Pharmacology, University of Bari, Italy, November 29, 1955.

Zusammenfassung

Bei ausreichender Dosierung ist Reserpin imstande, eine praktisch vollkommene Freisetzung des 5-Oxytryptamins (5-OT) aus den Blutplättchen und der Milz zu verursachen und eine partielle Freisetzung aus der Magen-Darmschleimhaut und dem Gehirn. Die Ausgangswerte werden dann nur langsam erreicht. 5-OT exogener Herkunft hindert die reserpinbedingte Ausschüttung des endogenen 5-OT.

[5] V. Erspamer, J. Physiol. *127*, 118 (1955).

Respiratory Changes in Decorticate Cats Following Transverse Sections Through the Hypothalamus

During acute experiments in this laboratory when transsections through the hypothalamus were made in 60 decorticate cats with a view to prepare diencephalic cats, approximately 20% of these animals exhibited very hurried and rather shallow respirations soon after the transverse section. Such changes in respiration were not seen in decerebrate, but were observed in diencephalic cats only.

This led to consideration of the possibility of the transverse section in these animals being at such a level whereby some respiratory centres were released from rostral inhibitory control.

Previous workers have obtained fairly comparable results form the stimulation, in man, of different parts of the hippocampus–mammillary body–anterior thalamic nuclei–cingulate gyrus complex[1], apnoea being a constant feature of stimulation of these areas besides facilitation or inhibition of somato-motor activity and autonomic changes etc. Recently Segundo *et al.*[2] observed that electrical stimulation of the fornix produced apnoea and other effects similar to that obtained with stimulation of structures between which it formed an important link; they further added that the "excitation of the 'anterior periventricular' region in man induced marked acceleration of the respiratory rate and diminution of its amplitude, the respiratory changes resembling that seen in the polypneic panting evoked from this region in animals[3]. Obviously, decending connections from this region pass to pontobulbar levels controlling respiratory activity and possibly subservs the regulation of body temperature[4]".

It thus appears possible that the transsections carried out during our experiments were through a plane rostral to the periventricular respiratory centres, thereby releasing them from inhibitory control. Further work on the subject is in progress[5].

S. R. Dasgupta and H. F. Häusler[6]

Department of Pharmacology, School of Tropical Medicine, Calcutta, October 18, 1955.

Zusammenfassung

Anscheinend bedingt die frontale Durchschneidung des Hypothalamus in der diencephalischen Katze eine Loslösung des vorderen periventrikulären Atemzentrums von höherer (rostraler) hemmender Kontrolle.

[1] W. P. Chapman, R. B. Livingston, and K. E. Livingston, Arch. Neurol. Psychiat. Chicago *62*, 701 (1949). – B. R. Kaada and H. J. Jasper, Arch. Neurol. Psychiat. Chicago *68*, 609 (1952). – W. T. Liberson, W. B. Scoville, and R. H. Dunsmore, J. EEG clin. Neurophysiol. *3*, 1 (1951).

[2] J. P. Segundo, R. Arana, E. Migliaro, J. E. Villar, A. GraciaGuelfi, and H. Gracia Austt, J. Neurophysiol. *18*, 96 (1955).

[3] H. W. Magoun, F. Harrison, J. R. Brobeck, and S. W. Ranson, J. Neurophysiol. *1*, 101 (1948).

[4] J. F. Fulton, *Physiology of the nervous system*, 3rd ed. (Oxford Univ. Press, 1949).

[5] In a recent communication to the writers, Dr. John F. Fulton informs that his colleague at the Yale University School of Medicine, Dr. Paul MacLean, has also noticed similar respiratory changes in the course of his experiments.

[6] Vorstand des Pharmakologischen Instituts der Universität Graz, Österreich; 1954/55 WHO-Professor, Department of Pharmacology, School of Tropical Medicine, Calcutta.

The Participation of the Adrenal and Thyroid in Fat Metabolism in Hypophysectomized Baboons (*Papio ursinus*)

The weight of hypophysectomized baboons can be manipulated within limits by appropriate treatment with cortisone or with adrenocorticotropic hormone (ACTH) and thyroxin[1]. Since these weight changes are linked with an increase or a decrease in depot fat, the role of the adrenal and of the thyroid in regulating fat metabolism in baboons has been further investigated.

The present report is based on results obtained from 30 baboons including 3 normal females, 5 hypophysectomized animals (1 adult male and 4 adult females, of which 1 was also thyroidectomized), 9 adrenalectomized females and 13 thyroidectomized animals, 3 of which were males. ACTH and cortisone were administered daily in 2 divided doses to hypophysectomized baboons on a body weight basis, namely, 1 mg cortisone per kg per day and 1 unit ACTH per kg per day. All hypophysectomized baboons, irrespectively of body weight, received 0·5 mg thyroxin 3 times per week.

Bilateral adrenalectomy in the baboon leads to progressive depletion of the fat depots with a loss of body weight, indicating first, that an intact adrenal is essential for maintenance and expansion of the fat depots, and secondly, that mobilisation of fat from the depots can be achieved in the absence of the adrenal. It is to be recalled in this connection that adrenalectomy prevents the fatty liver in rats known to result from poisoning with phosphorus or following injections or extracts of anterior pituitary gland[2], and this in the face of active fat synthesis said to occur in liver slices obtained from adrenalectomized rats[3].

Complete thyroidectomy of male and female baboons is not associated with the development of a fatty liver even when observed over a four-year period. In this respect the baboon behaves differently from the dog[4].

Removal of the pituitary can be followed by a steady gain in weight attributable largely to expansion of intra-abdominal and subcutaneous fat depots, provided the dietary whims of the animals are gratified. The gain in weight would appear to be of the kind demonstrated in hypophysectomized rats after forced feeding[5] and confirms the suggestion made by Russell[6] that accelerated removal of carbohydrate by hypophysectomized animals, in the face of a high respiratory quotient and a low metabolic rate, is indicative of active fat synthesis in excess of utilisation. Unlike the dog[4], the hypophysectomized baboon fails to develop a fatty liver even at the end of 8 months after operation.

Treatment of hypophysectomized baboons with cortisone or ACTH leads at first to a decrease in body weight which continues for 7 to 14 days[1]. Thereafter, the marked improvement in appetite is attended by a steady gain in weight, particularly noticeable in baboons treated for more than 26 days. In the initial stages of treatment, a mild periportal fatty infiltration occurs in the liver. As the weight increases, fat disappears from the liver, as revealed by serial puncture biopsy specimens, but accumulates in massive quantities in the subcutaneous tissues of the neck, axilla, breast, pericardium, retro-abdominal tissues and in the mesentery, the greater omentum alone weighing over 900 g in one animal.

During the early stages of treatment with cortisone or ACTH the loss of body weight is apparently due to tissue catabolism and would explain, in rats, the inhibition of lipogenesis from carbohydrates and acetates both by cortisone and ACTH[3]. The subsequent gain in weight of hypophysectomized baboons is in accordance with the well-known clinical observations in man that long-continued treatment with ACTH or cortisone can promote the deposition of fat in various parts of the body. The observations in baboons also confirm the initial catabolic effect of treatment with cortical hormones in "normal" rats and the finding that fat storage may be favoured in those animals which survive the preliminary treatment[7]. Accumulation of fat in the depots of hypophysectomized baboons subsisting on high carbohydrate diets in response to prolonged treatment with ACTH or cortisone more than suggests that the fat is derived from carbohydrate sources. Furthermore, both cortisone and ACTH can promote synthesis and deposition of fat in a thyroidectomized-hypophysectomized baboon. It still remains to be established whether a similar effect can be induced by these hormones in pancreatectomized baboons.

The second-stage effect of cortisone on body weight in hypophysectomized baboons can be counteracted by the simultaneous administration of adequate amounts of thyroxin. Arrest or reduction of body weight is accompanied also by a reduction in the blood lipids. Withdrawal of cortisone and thyroxin is followed within 14 days by the progressive deposition of fat in the liver which eventually becomes as severe as that described in the livers of malnourished infants[8]. The mechanism underlying the development of this type of fatty liver is now being investigated.

The experiments in baboons cited above indicate that despite depression of adrenal activity following hypophysectomy, sufficient adrenal function persists to maintain life and, probably in conjunction with insulin, to promote a measure of synthesis and deposition of fat from carbohydrates and possibly from protein precursors. This synthesis and increase in the fat depots can be intensified by the administration of cortisone or ACTH and counteracted by thyroxin.

The authors wish to record their sincere thanks to Dr. E. Epstein who carried out the hypophysectomies in the baboons.

J. Gillman and Christine Gilbert

Departments of Physiology and Anatomy and Joint Nutrition Research Unit of the Council for Scientific and Industrial Research and the University of the Witwatersrand, Johannesburg, October 11, 1955.

Zusammenfassung

1. Im Gegensatz zum Hund entwickelt sich beim Pavian keine Fettleber nach Hypophysektomie oder Thyreoidektomie oder nach einer Kombination dieser beiden Eingriffe.

[1] J. Gillman and C. Gilbert, in press, 1955.

[2] E. G. Fry, Endocrinology *21*, 283 (1937). – E. M. McKay and R. H. Barnes, Amer. J. Physiol. *118*, 525 (1937).

[3] I. D. Welt and A. E. Wilhelmi, Yale J. Biol. Med. *23*, 99 (1950).

[4] I. L. Chaikoff, T. Gillman, C. Entenman, J. F. Rinehart, and F. L. Reichert, J. exper. Med. *88*, 1 (1948).

[5] L. T. Samuels, R. M. Reinecke, and K. L. Bauman, Endocrinology *33*, 87 (1943).

[6] J. A. Russell, Amer. J. Physiol. *121*, 755 (1938).

[7] H. C. Stoerk and C. C. Porter, Proc. Soc. exper. Biol. Med. *74*, 65 (1950).

[8] J. Gillman and T. Gillman, *Perspectives in human malnutrition* (Grune and Stratton, 1951).

2. Thyroxin wirkt als Antagonist hemmend auf die Fettbildung, die durch Cortison beim hypophysektomierten Pavian angeregt wird.

3. Starke Leberverfettung entsteht bei hypophysektomierten Pavianen nach gleichzeitiger Entziehung von Cortison und Thyroxin.

Effect of Hormonal and Dietary Treatments on Lipogenesis from Acetate in Hereditarily Obese Hyperglycemic Mice[1]

In a series of publications (e.g. Bates, Mayer, and Nauss[2]; Bates, Zomzely, and Mayer[3]; Mayer and Zighera[4]) it has been shown that mice with the hereditary obese hyperglycemic syndrome were characterized by an increased rate of acetate incorporation into fatty acids over their non obese litter mates, even under conditions of paired feeding, restricted feeding or fasting. Under such conditions, goldthioglucose obese mice, hypothalamic hyperphagic rats and hypothalamic mice do not exhibit such an increase. Under conditions of *ad libitum* intake lipogenesis from acetate in obese mice can reach four times the normal value.

A possible explanation of the mechanism of development of the hereditary obese hyperglycemic syndrome has been offered (Mayer, Andrus, and Silides[5]). It was suggested that these animals were characterized by hypersecretion of a pancreatic hyperglycemic hormone, presumably glucagon and a secondary hypersecretion of insulin. It was further suggested that growth hormone may be trophic to the hyperglycemic factor. It has since been demonstrated (Wrenshall, Andrus and Mayer[6]) that mice with the syndrome did in fact show hyperplasia of the islets of Langerhans, and an increased pancreatic insulin content, in spite of degranulation of cells, consistent with a picture of hypersecretion. As for the possibility of increased glucagon secretion, it has been shown that the mice show a considerably increased rate of glycogen turnover (Shull and Mayer[7]), corresponding increased liver phosphorylase activity (Shull, Ashmore, and Mayer[8]) and a sixfold increase in pancreatic glucagon content after treatment with growth hormone (Clarke, Wrenshall, and Mayer[9], to be submitted). Normal mice do not show this increase. Growth hormone induces hyperglycemia in obese mice (Mayer and Silides[10]; Shull and Mayer[7]) and obese mice are particularly sensitive to glucagon (Shull and Mayer[7]). In view of these considerations, it appeared of particular interest to see how insulin, insulin combined with hyperglycemia, growth hormone and glucagon affected acetate incorporation in mice with the obese hyperglycemic syndrome and their controls. Because these obese mice on a high fat diet, unlike goldthioglucose (Marshall and Mayer[11]) and hypothalamic (Mayer *et al.*[12]) obese mice, are considerably slowed down in their rate of weight gain (Mayer and Jones[13]), it appeared worthwhile to compare effects of this diet on the acetate incorporation into fatty acids in obese and non obese animals.

Methods. The animals used were hereditarily obese hyperglycemic mice, and their non obese litter mates, 4 to 6 months of age. The weight of the obese mice were in the 40 to 60 g range, that of the non obese 20 to 30 g. All animals were housed in individual cages for at least 3 days prior to the experiment. Unless otherwise noted they were fed Purina Laboratory chow *ad libitum*. Fasted animals were subjected to an 18 h fast. The animals on the high fat diet were fed for the 10 days preceeding the experiment the carbohydrate free diet previously described (Mayer and Jones[13]). The C^{14} carboxyl labeled acetate was given intraperitoneally in 0·5 cm^3 water solution in measured doses of approximately 10^6 c.p.m. in the case of the obese animals and 10^6 c.p.m. in the case of the non obese. Hormones and glucose were given intraperitoneally in 0·25 cm^3 solution. Doses are given in the Table. In the case of the studies using insulin, insulin alone, or insulin with glucose, these injections were given 15 min before labeled acetate administration. In the experiment in which both insulin and glucose were given blood glucose determinations showed that the non obese animals were hyperglycemic (levels of 200 mg % or more) for at least 20 min following injections. The blood glucose levels were back at pretreatment levels after 30 min. Control saline injections had no such effect. Glucagon was injected 10 min before acetate was given. The animals were sacrificed 30 min after acetate administration. The procedure used to determine counts retained in liver and carcass (defined as body *minus* liver) fatty acids has been described in detail previously (Bates, Mayer, Nauss[3]; Bates, Zomzely, Mayer[4]). The significance and limitations of the method have been discussed in a recent paper (Bates, Zomzely and Mayer).

Results and discussion. The results, expressed in percent counts retained multiplied by 10^3, are given in the Table. Significance of the differences with the untreated animals, calculated by Student's "t" method, are included. It is readily seen that insulin considerably increases lipogenesis from acetate both in non obese and in obese animals. The fact that the level reached in the carcass of the obese animals is hardly higher than that reached by the non obese animals may indicate that the upper limit is set by factors other than circulating insulin or that, alternately, the dose of insulin given is very large in comparison to the amount of circulating insulin. Liver synthesis was increased proportionately less than peripherial synthesis. The effect of growth hormone, studied at two time intervals because of the observed delay in the hyperglycemic action in obese mice (Shull and Mayer[7]), shows that growth hormone

[1] Supported in part by Grant No. A–49, National Institutes of Arthritis and Metabolism, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland; Sugar Research Foundation, New York; Kellog Company, Battle Creek, Michigan; and The Nutrition Foundation, Inc., New York.

[2] M. W. Bates, J. Mayer, and S. F. Nauss, Amer. J. Physiol. *180*, 304 (1955).

[3] M. W. Bates, C. Zomzely, and J. Mayer, Amer. J. Physiol. *181*, 187 (1955).

[4] J. Mayer and C. Y. Zighera, Exper. *11*, 358 (1955).

[5] J. Mayer, S. B. Andrus, and D. J. Silides, Endocrinology *53*, 572 (1953).

[6] G. A. Wrenshall, S. B. Andrus, and J. Mayer, Endocrinology *56*, 335 (1955).

[7] K. H. Shull and J. Mayer, Endocrinology (in press).

[8] K. H. Shull, J. Ashmore, and J. Mayer, Arch. biochem. (in press).

[9] D. W. Clarke, G. A. Wrenshall, and J. Mayer, to be submitted.

[10] J. Mayer and D. J. Silides, Endocrinology *52*, 54 (1953).

[11] N. B. Marshall and J. Mayer, Amer. J. Physiol. *178*, 271 (1954).

[12] J. Mayer, R. G. French, C. Y. Zighera, and R. J. Barrnett, Amer. J. Physiol. *182*, 75 (1955).

[13] J. Mayer and A. K. Jones, Amer. J. Physiol. *175*, 339 (1953).

[14] J. Bornstein, E. Reid, and F. G. Young, Nature *168*, 903 (1951).

Acetate incorporation into fatty acids following hormone and dietary treatment.

Treatment	Obese animals		Non obese animals		Total retention	
	Carcass	Liver	Carcass	Liver	Obese	Non obese
Controls: ¼ cm³ Saline	1088 ± 245 26 animals	892 ± 194 25 animals	324 ± 113 14 animals	181 ± 118 14 animals	1980 ± 318 26 animals	505 ± 197 14 animals
Insulin · 3 IU/mouse	2146 ± 189^{++} 6 animals	986 ± 202 6 animals	2102 ± 395^{++} 6 animals	498 ± 150^{++} 6 animals	3132 ± 166^{++} 6 animals	2600 ± 500^{++} 6 animals
Insulin · 3 IU/mouse + glucose 100 mg/mouse	1622 ± 390^{++} 10 animals	1251 ± 360^{++} 10 animals	1999 ± 268^{++} 10 animals	283 ± 74^{+} 10 animals	2873 ± 472^{++} 10 animals	2282 ± 224^{++} 10 animals
Growth Hormone 2 mg/mouse 3 h after	680 ± 115^{++} 6 animals	549 ± 244^{++} 6 animals	1043 ± 231^{++} 6 animals	252 ± 67 6 animals	1229 ± 345^{++} 6 animals	1295 ± 276^{++} 6 animals
Growth Hormone 2 mg/mouse 12 h after	987 ± 248 10 animals	862 ± 267 10 animals	472 ± 174^{++} 10 animals	210 ± 101 10 animals	1849 ± 263 10 animals	682 ± 261 10 animals
H.G.F. 100 µg/mouse	841 ± 188^{++} 10 animals	495 ± 85^{++} 10 animals	1127 ± 259^{++} 10 animals	116 ± 52^{++} 10 animals	1336 ± 233^{++} 10 animals	1243 ± 329^{++} 10 animals
Fasting	353 ± 70^{++} 6 animals	26 ± 6^{++} 6 animals	208 ± 59^{+} 6 animals	7 ± 3^{++} 6 animals	379 ± 63^{++} 6 animals	215 ± 41^{++} 6 animals
Fasting + 100 µg/mouse H.G.F.	—	—	503 ± 217^{++} 6 animals	46 ± 33^{+} 6 animals	—	549 ± 242 6 animals
High Fat Diet	572 ± 166^{++} 6 animals	21 ± 13^{++} 6 animals	225 ± 76 6 animals	12 ± 5^{++} 6 animals	593 ± 174^{++} 6 animals	237 ± 72^{++} 6 animals

1. All data are expressed as percent counts × 10^3.
2. Figures following ± are standard deviations.
3. Significance of differences with untreated values calculated by Student's method: $^{+}\ p < 0{\cdot}05$, $^{++}\ p < 0{\cdot}01$.

administration has opposite actions as regards acetate incorporation in obese and in non obese animals. It decreases lipogenesis from acetate in the obese mice, at least at the 3 h interval, but it increases lipogenesis from acetate very significantly in the non obese animals. This finding may give an interpretation to the fact that growth hormone has a hyperglycemic action in the obese animals and not in the non obese animals. The effect of glucagon on both the obese and the non obese animals is similar to that of growth hormone: decreased lipogenesis from acetate in obese animals, increased lipogenesis in the non obese. Again these findings may give an interpretation of the differential effects of glucagon on blood sugar. The similarity between the effects of growth hormone and glucagon in this respect may also be construed to indicate that part of the action of growth hormone may be mediated through increased glucagon secretion. This suggestion is supported by previous evidence on the effect of diethyldithiocarbamate (DEDTC) administration (Mayer, Andrus, and Silides)[5] and increased pancreatic glucagon in the obese animals following growth hormone administration. This concept is also in accord with the results of Bornstein, Reid, and Young[14] and Foa *et al.*[15]. On the other hand the fact that glucagon, but not growth hormone, causes an increase in the blood sugar level of fasted obese mice is still unexplained. It could be due to concentration or to a delay of action effect. Fasting as previously shown considerably decreases lipogenesis from acetate in obese as well as in non obese animals. As has been shown to be characteristic of "metabolic obesity" the rate of lipogenesis is still significantly higher ($p < 0{\cdot}01$) in fasted obese than in fasted non obese mice. When glucagon is given to fasted non obese mice the resultant lipogenesis picture is very similar to that obtained in untreated fasted obese mice, a finding of particular interest in view of the suggested etiology. Finally, placing the animals on a high fat diet depresses lipogenesis from acetate both in the obese and in the non obese animals. In view of the considerable slow down in weight gain shown by obese hyperglycemic mice on this diet it is of interest to note that the decrease in lipogenesis, is both proportionately and absolutely, much greater in obese than in non obese mice.

D. J. Silides and J. Mayer

Department of Nutrition, Harvard University, School of Public Health, Boston, October 27, 1955.

Zusammenfassung

Es wird die Wirkung einer Behandlung mit verschiedenen Hormonen und Kostformen auf den Azetateinbau in Fettsäuren bei erblich fettsüchtigen Mäusen und ihren normalen Geschwistern aus dem gleichen Wurf untersucht. Insulin, mit und ohne Glukose verabreicht, steigert die Lipogenese bei beiden Mäusetypen. Wachstumshormon und Glukagon vermindern den Azetateinbau bei den fettsüchtigen, vermehren ihn aber bei nichtfetten Tieren. Glukagon bewirkt bei normalen Tieren eine Steigerung der Einbaurate, die der bei unbehandelten fettsüchtigen gleichkommt. Fütterung einer fettreichen Kost senkt die Lipogenese bei fettsüchtigen Mäusen in stärkerem Ausmass als bei nichtfettsüchtigen.

[15] P. P. Foa, H. R. Weinstein, E. B. Magid, M. D. Glassmann, and J. A. Smith, Proc. XIXth Internat. Congr. Montreal 1953, p. 352.

Über den Zusammenhang zwischen histologischer Struktur und funktionellem Verhalten des Skelettmuskels

Auf Grund ausgedehnter histologischer Untersuchungen kam Krüger[1] mit seinen Schülern zu einer Einteilung der Muskelzellen in «fibrillenstrukturierte» und «felderstrukturierte». Auf diesem histologischen Befund aufbauend postulierte Krüger, dass die fibrillenstrukturierten Muskelzellen für das tetanische und die felderstrukturierten Muskelzellen für das tonische Verhalten der Skelettmuskulatur auch von Säugetieren verantwortlich seien. Wir prüften diese Hypothese durch gleichzeitige Untersuchungen der Struktur und der Funktion zweier Rattenmuskeln, von denen der eine nur fibrillenstrukturierte Fasern aufwies (*M. serratus lateralis*, kaudaler Teil). In Ermangelung eines rein felderstrukturierten Muskels benutzten wir das aus den beiden Typen von Muskelzellen bestehende Zwerchfell der Ratte (Günther[2]).

In der experimentellen Anordnung des Nerv-Muskel-Präparates untersuchten wir das Verhalten dieser beiden Muskeln nach elektrischer Reizung und Zusatz von Azetylcholin und neuromuskulär blockierenden Substanzen. Zwischen den beiden strukturell so verschiedenen Muskeln ergab sich kein unterschiedliches funktionelles Verhalten. Nach Denervierung gewinnt der Skelettmuskel «tonische» Eigenschaften, denn er reagiert auf Zusatz von Azetylcholin mit einer Kontraktur. Das zeitliche Auftreten dieser Reaktionsform nach Denervierung wurde ausführlich von uns (Muscholl und Lüllmann[3]) am Zwerchfell und in Stichproben am *M. serratus* (Lüllmann und Brunner[4]) untersucht. Nach Reinnervation des Diaphragma zeigt dieses wieder dasselbe funktionelle Verhalten wie der normale Muskel.

Zu diesen einzelnen Stadien stellten wir mit der von Krüger benutzten Technik (Susa-Fixierung, Heidenhain-Eisenhämatoxylin) die histologischen Präparate her, um das Verhalten der felder- und fibrillenstrukturierten Muskelfasern bei den verschiedenen Funktionsänderungen zu beobachten.

Während bereits am 2. Tage nach Denervierung des Zwerchfelles durch Zusatz von Azetylcholin eine Kontraktur auszulösen ist, beginnen die ersten Veränderungen im histologischen Bild sich erst am 5. Tage nach Denervierung auszubilden. Am 10. Tage nach Denervierung ist dieser Prozess sehr ausgeprägt: die fibrillen- und die felderstrukturierten Fasern haben die für sie typische Fibrillenanordnung verloren und sich in ihrer Struktur einander angeglichen. Sie sind nicht mehr zu unterscheiden. Das Verhalten auf elektrische Reize (Zuckungsdauer und tetanische Verschmelzungsfrequenz) wird vom Denervationsprozess nicht beeinflusst. In dem chronischen Atrophiestadium bleibt dieses funktionelle Verhalten bestehen, obwohl der histologische Destruktionsprozess fortschreitet.

Nach Reinnervation zeigt das Zwerchfell in den von uns geprüften Versuchsanordnungen ein dem normalen Zwerchfell gleiches Verhalten. Der histologische Aufbau dagegen ist völlig von dem des intakten Zwerchfells verschieden. Alle Zellen zeigen dieselbe Anordnung und dasselbe Aussehen der Muskelfibrillen. Der Aufbau des Muskelzellquerschnittes liegt zwischen der Felder- und der Fibrillenstruktur.

Nach Entnervung ändert auch der rein fibrillenstrukturierte *M. serratus lateralis* (kaudaler Abschnitt) sein funktionelles Verhalten früher, als eine histologische Änderung sichtbar wird. Die Reaktionen des denervierten *M. serratus* gleichen denen des denervierten Zwerchfelles; histologisch tritt ebenfalls ein Verlust der Fibrillenstruktur wie bei den entsprechenden Fasern des Zwerchfells auf. Auf elektrische Reize hin verhält sich dieser denervierte Muskel ebenso wie vor der Denervation, das heisst, er führt schnelle Zuckungen aus.

Eine ausführliche Darstellung der histologischen Befunde erfolgt im Anatomischen Anzeiger.

G. Kuschinsky, H. Lüllmann, W. Hoefke und E. Muscholl

Pharmakologisches Institut der Universität Mainz, den 3. Oktober 1955.

Summary

A stimultaneous investigation of the function and the histological structure of two different muscles of the rat showed no relation between the arrangement of the fibrilles in the muscle cell and the function of the muscle. Such a relation between structure and function was assumed by Krüger on the basis of histological investigations, but our findings do not support this hypothesis.

[1] P. Krüger, *Tetanus und Tonus der quergestreiften Skelettmuskeln der Wirbeltiere und des Menschen* (Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig 1952).

[2] P. G. Günther, Acta anat. *14*, 54 (1952); Ärztl. Forsch. *8*, 217 (1954).

[3] E. Muscholl und H. Lüllmann, Arch. exper. Path. Pharmakol. *226*, 88 (1955).

[4] H. Lüllmann und H. Brunner, Arch. exper. Path. Pharmakol. *223*, 254 (1954).

Die α-Glycerophosphat-Oxydation des Heuschreckenbrustmuskels *(Locusta migratoria)*[1]

Trotzdem die physiologischen Bedingungen und vielleicht auch der Umfang der Muskelarbeit bei den Insekten erheblich von den bei den Vertebraten bekannten Verhältnissen abweichen (zum Beispiel in Sauerstoffversorgung und -verbrauch), liessen sich bis dahin keine Unterschiede im Stoffwechsel der Muskulatur beider Gruppen nachweisen. Lediglich mehrere Beobachtungen auffallend niedriger RQ-Werte, die einige Insektenarten während des Fluges aufweisen (um 0,7)[2], deuten auf die Möglichkeit hin, dass sich hier vielleicht andere, von den Wirbeltieren mehr oder weniger verschiedene oder wenigstens bei diesen nicht im Mittelpunkt des Stoffwechselgeschehens stehende Reaktionen abspielen könnten. Zur Klärung dieser Frage wurde die Fähigkeit des Insektenmuskels untersucht, die verschiedenen Intermediärprodukte des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels umzusetzen. Versuche mit α-Glycerophosphat (GP) zeitigten dabei überraschende Ergebnisse, die wegen ihres besonderen Interesses hier isoliert mitgeteilt werden sollen.

Hauptuntersuchungsobjekt war die Brustmuskulatur der Wanderheuschrecke *Locusta migratoria*, die nach Dekapitierung der Tiere schnellstens herauspräpariert und mit Hilfe eines Homogenisators nach Potter-Elvehjem oder eines einfachen Mörsers homogenisiert wurde. Als Flüssigkeit diente dabei entweder eiskaltes destilliertes Wasser oder 0,154 *m* KCl-Lösung. Die Durch-

[1] Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

[2] A. Krogh und T. Weis-Fogh, J. exper. Biol. *28*, 344 (1951). – T. Weis-Fogh, Phil. Trans. roy. Soc. [B] *237*, 1 (1952). – E. Zebe, Z. vgl. Physiol. *36*, 290 (1954).

führung der Untersuchungen erfolgte dann nach der Warburgtechnik in Standardreaktionsgefässen bei einer Temperatur von 37°C in Luft.

Durch Variation der einzelnen Faktoren unter Konstanterhaltung der übrigen wurden die optimalen Bedingungen für die Oxydation von α-Glycerophosphat durch Homogenat aus Heuschreckenmuskulatur ermittelt[3]. Als Medium diente dabei 0,05 *m* Phosphatpuffer.

Tabelle I

Konzentration von Glycerophosphat Q_{O_2}			0,257 *m* 18,6	0,175 *m* 22,0	0,087 *m* 45,7	0,044 *m* 33,9	0,009 *m* 16,9	1 2
pH	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	9,0	10,0[2]
Q_{O_2}	52,1	54,5	57,0	69,0	75,1	69,0	65,5	43,6

[1] Stets Endkonzentration.
[2] Mit 8×10^{-6} *m* Cytochrom *C*, 7×10^{-6} *m* DPN, pH 7,5.

Die stärkste Oxydation von α-Glycerophosphat erfolgte demnach bei einer Konzentration dieses Substrates von 0,087 *m*. Der pH-Bereich, in dem die Reaktion maximal ablief, war verhältnismässig weit und reichte etwa von pH 7,0 bis 9,0. Eine deutliche Spitze lag jedoch bei pH 7,5.

Durch Zusatz von Cytochrom *C* zum mit Glycerophosphat inkubierten Homogenat liess sich der Sauerstoffverbrauch um etwa 50% steigern. Die Endkonzentration dieser Substanz musste dabei mindestens 8×10^{-6} *m* betragen. Die gleiche Wirkung konnte bei Verwendung von Methylenblau an Stelle von Cytochrom beobachtet werden. Auch mit Hilfe von DPN in der Konzentration von 7×10^{-6} *m* konnte eine Zunahme des Sauerstoffverbrauchs erreicht werden, allerdings nur in wesentlich geringerem Umfange. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Cytochrom *C* und DPN wurde maximale Atmung festgestellt.

Tabelle II

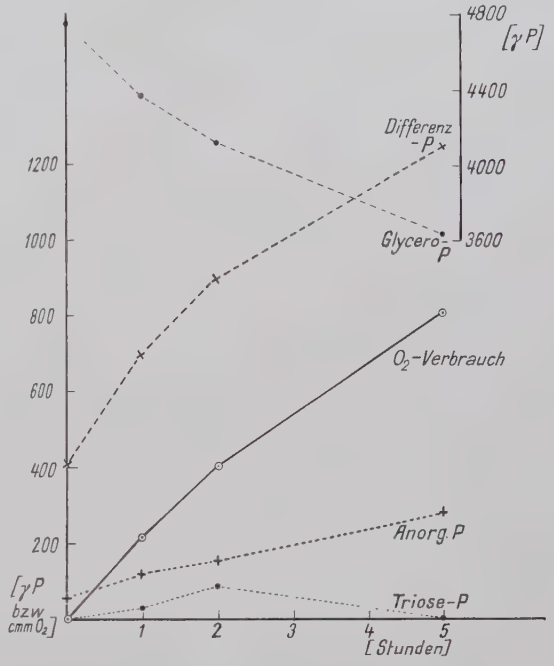
	GP allein	GP + DPN	GP+Cyt.*C*	GP + DPN + Cyt.*C*[1]
Q_{O_2}	44,0	54,3	67,9	76,4

[1] 0,087 *m* Glycerophosphat, pH 7,5.

Dass der Umsatz von Glycerophosphat schon ohne besonderen Zusatz von Cofermenten in beträchtlichem Umfange erfolgte, mag durch den relativ hohen Gehalt der Insektenmuskulatur an diesen Substanzen bedingt sein.

Cyanid bewirkte in einer Konzentration von 6×10^{-4} *m* eine etwa 90%ige Hemmung der Sauerstoffaufnahme, bei der zehnfachen Menge eine vollständige Sistierung, vorausgesetzt, dass als Wasserstoffakzeptor Cytochrom diente.

Um festzustellen, inwieweit der gemessene Sauerstoffverbrauch der Oxydation von Glycerophosphat entspricht und ob und welche weiteren Oxydationsschritte daran ebenfalls noch beteiligt sind, wurde in Parallelversuchen die Reaktion nach verschiedenen Zeiten (1,2 und 5 h) durch Eiweissfällung mit Trichloressigsäure unterbrochen. Als Medium diente dabei Glykokoll/NaOH-Pfuffer pH 8,3. Durch Bestimmung der einzelnen Fraktionen des säurelöslichen Phosphats nach der gebräuchlichen Methode von Jendrassik konnten deren Veränderungen festgestellt werden. Es wurde der Gehalt des Trichloressigsäureextrakts von Homogenat der Heuschreckenmuskulatur an folgenden Phosphorverbindungen gemessen: Gesamtphosphat, anorganisches Phosphat, Triosephosphat[4], Glycerophosphat[5] und aus der Differenz die Summe der übrigen Phosphorsäureester. Der Gehalt an Triosephosphat, also dem ersten Oxydationsprodukt, ergab nach 2 h den höchsten Wert, wenngleich dieser auch nur einen geringen Bruchteil des



auf Grund des Sauerstoffverbrauchs zu erwartenden ausmachte. Nach 5 h liess sich keinerlei Triosephosphat mehr nachweisen. Das anorganische Phosphat zeigte eine konstante Zunahme, bis schliesslich das Vierfache der Ausgangskonzentration erreicht war. Der Anstieg der aus der Differenz ermittelten Phosphorverbindungen erfolgte ebenfalls ziemlich konstant auf das Drei- bis Vierfache der Ausgangsmenge. Die Reaktion war also nicht mit der Bildung des Dioxyacetonphosphats beendet worden, sondern erheblich weiter gelaufen. Mit Fortschreiten der Reaktionszeit wurde trotz Gegenwart grösserer Mengen unoxydierten Glycerophosphats der Anteil der Oxydation dieser Verbindung am verbrauchten Sauerstoff immer geringer. Nach 1 h betrug der aus der Abnahme des Glycerophosphats berechnete Sauerstoffverbrauch 63% des tatsächlich gemessenen, nach 2 h 57% und nach 5 h nur noch 51%.

Es liegt nahe, bei der Deutung einer so ausgeprägten Fähigkeit zur Oxydation von α-Glycerophosphat durch den Heuschreckenbrustmuskel an dessen (direkte?) Ausnutzung von Fetten als Energiequelle für die Arbeitsleistung zu denken. Indessen dürfte wohl der Abbau des Glycerinanteils des Fetts allein das Vorhandensein eines derartig wirksamen Mechanismus nicht befriedigend er-

[3] Razemisches Präparat der Firma Fluka, Buchs, Schweiz.

[4] O. Meyerhof und K. Lohmann, Biochem. Z. *271*, 89 (1934).

[5] C. F. Burmaster, J. biol. Chem. *164*, 233 (1946), beide zitiert in L. Hoppe-Seyler/Thierfelder, *Handbuch der physiolog. und patholog. Chemie* (10. Auf.) III/1.

klären, macht er doch nur etwa 10% des Gesamtgewichts des Fettes aus. Aus diesem Grunde erschien es von besonderem Interesse, unter vergleichendem Gesichtspunkt mit der gleichen Methodik Untersuchungen an verschiedenen Gruppen der Insekten einerseits und Vertretern der Wirbeltiere andererseits durchzuführen. Als Bezugssystem und Maßstab für die Aktivität des Glycerophosphatoxydasesystems sowie als Hinweis auf den Grad der Wirksamkeit der übrigen fermentativen Eigenschaften der verschiedenen Muskeln wurde stets das Succinoxydasesystem gleichzeitig und gleichfalls unter optimalen Bedingungen getestet.

Das Ergebnis dieser Experimente bestätigte die schon bekannte Tatsache, dass der Insektenmuskel in seiner Stoffwechselintensität den Wirbeltiermuskel bei weitem übertrifft[6]. Der Q_{O_2} ergibt bei ihm nach Zusatz von Bernsteinsäure Werte, die bis zu einer Zehnerpotenz höher liegen als bei jenem. Der Sauerstoffverbrauch des mit α-Glycerophosphat inkubierten Muskels beträgt bei Ratte und Taube nur einen Bruchteil des mit Succinat gemessenen. Überraschenderweise verhält sich die Muskulatur der untersuchten Insekten in dieser Hinsicht vollkommen anders. Sie besitzt die Fähigkeit, Glycerinphosphorsäure in mindestens dem gleichen Umfange, in einigen Fällen sogar deutlich stärker umzusetzen als Bernsteinsäure.

Tabelle III

	Succinat	Glycerophospat
Locusta migratoria	69	80,5
Melolontha vulgaris	105	133
Metopsilus porcellus . . .	53	79
Apis mellifica	119	144
Ratte.	14	4
Taube	23	3

Überraschend dabei ist die Tatsache, dass in dieser Eigenschaft anscheinend keinerlei Unterschiede bestehen zwischen dem Stoffwechseltyp derjenigen Insekten, die als Energiequelle für die Muskelarbeit allein Kohlenhydrate auszunutzen vermögen (zum Beispiel Biene), und jenem, der zu diesem Zweck in erster Linie Fette heranzieht (zum Beispiel Wanderheuschrecken und Schmetterlinge). Die so auffällige Fähigkeit zur Oxydation von α-Glycerophosphat in grossem Umfange steht demnach wohl nicht in besonderem Zusammenhang mit dem Fettstoffwechsel. Vielmehr scheint es sich hier um eine spezifische Fähigkeit des Insektenmuskels ganz allgemein zu handeln. Über deren Bedeutung lassen sich vorläufig freilich nur Vermutungen anstellen.

Die Untersuchungen werden erweitert und fortgesetzt.

Herrn PD Dr. G. Siebert möchte ich für seine Unterstützung der Arbeit in Rat und Tat danken.

E. Zebe

Zoologisches Institut der Universität Mainz, den 3. November 1955.

Summary

The conditions were studied for the glycerophosphate oxidation by homogenate from locust flight muscle, and the O_2-consumption was measured. Maximal oxidation rates were found with 0·087 *m* glycerophosphate, 8×10^{-6} *m* cytochrome *c*, 7×10^{-6} *m* DPN and pH 7·5. The production of dihydroxyacetone phosphate is followed by further oxidation steps, as could be shown by estimation of the different fractions of acid-soluble phosphate. Comparative studies were made on different insects and vertebrates. The rate of succinate oxidation by insect muscle was found to be ten times higher than that of vertebrate muscle. The relation of glycerophosphate oxidation to succinate oxidation is quite different in insects and vertebrates, but no difference could be detected between the two types of muscle metabolism of insects: the carbohydrate and the fat-utilizing type.

[6] W. H. McShan, S. Kramer und V. Schlegel, Biol. Bull. *106*, 341 (1954).

Modifikation der histologischen und hämatologischen Veränderungen bei Ratten nach Gaben von Trichlortriäthylamin-Hydrochlorid-Lösungen durch Äthernarkose

Eine grosse Reihe von chemischen Stoffen wirkt auf die Zellteilung ähnlich wie kurzwellige Strahlungen. Zu solchen Stoffen, welche als Radiomimetika bezeichnet wurden, gehören auch die N-Lost-Verbindungen (Dustin[1]). In den letzten Jahren verbreitete sich die Anwendung dieser Stoffe in der Klinik bei den verschiedensten Krankheiten.

Betreffend den Wirkungsmechanismus dieser Mitosegifte wurden zahlreiche Untersuchungen unternommen. Am besten sind wir über die Wirkung dieser Stoffe auf Proteine, SH-Substanzen, Nukleinsäuren und Fermente informiert (Bacq[2], Goldacre[3], Larionov[4], Colter und Quastel[5]). Eine grosse Reihe von Arbeiten beschäftigte sich mit histologischen und hämatologischen Veränderungen nach Verabreichung dieser Stoffe (Kindred[6], Jacobson[7], Gohr[8]). Betreffend der Wirkung von N-Lost-Stoffen im tierischen Organismus wurde bisher der Einfluss des Nervensystems nicht in Betracht gezogen. In der uns zugänglichen Literatur findet man nur eine einzige Angabe über diese Frage (Larionov[4]), es werden aber keine experimentellen Beweise angeführt.

Da es bekannt ist, dass Narkotika die Reaktion des tierischen Organismus auf Strahlung mindern und die Überlebungsrate stark modifizieren (Kahn[9], Patterson[10], Praslička[11]), unternahmen wir Versuche, um den Einfluss der Äthernarkose auf histologische und hämatologische Veränderungen bei Ratten nach Trichlortriäthylamin-Injektionen zu verfolgen.

Als Versuchstiere benutzten wir Ratten. Die Gesamtzahl der Tiere betrug 40 Exemplare. Die Menge des ge-

[1] P. Dustin, Nature *159*, 749 (1947); Bruxelles Méd. *48* (1947); C. r. Soc. biol. Paris *142*, 1433 (1948).

[2] Z. M. Bacq, Exper. *2*, 349 (1946); *2*, 385 (1946); Nature *159*, 478 (1947).

[3] R. S. Goldacre, A. Loveless und W. C. G. Ross, Nature *163*, 667 (1949).

[4] L. F. Larionov, Lečenie belokrovija limfogranulematoza embichinom (Moskau 1951).

[5] J. S. Colter und J. H. Quastel, Nature *166*, 773 (1950).

[6] E. J. Kindred, Arch. Pathol. *43*, 253 (1947)

[7] L. O. Jacobson und Mitarbeiter, J. Lab. Clin. Med. *34*, 902 (1949).

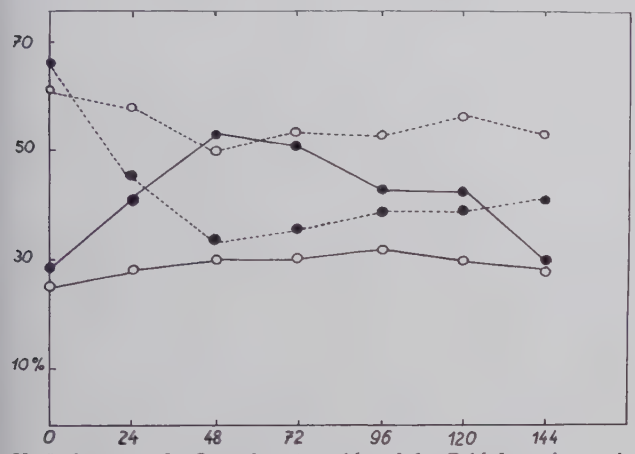
[8] M. Gohr und Mitarbeiter, Z. ges. inn. Med. und Grenzgeb. *15*, 692 (1953).

[9] J. B. Kahn, Proc. Soc. exper. Biol. Med. *78*, 486 (1951).

[10] H. M. Patterson und Mitarbeiter, Science *115*, 547 (1952).

[11] M. Praslička, Čs. Biologie *3*, 198 (1954); *4*, 88 (1955).

spritzten N-Lost-Stoffes betrug 0,5 mg und 6 mg je kg Gewicht. Zu den Versuchen mit Letaldosen (6 mg/kg) wurden 16 Tiere, zu den Versuchen mit 0,5 mg je kg wurden 24 Tiere angewendet. Bei den Versuchstieren (Äthertiere) wurde die Äthernarkose 10–15 min vor der N-Lost-Stoff-Injektion eingeführt, und die Ratten wurden nach der Injektion noch 45 min lang in der Äthernarkose gehalten. Die Kontrollratten bekamen nur die entsprechende Menge von N-Lost-Stoff. Bei allen Tieren wurden die Injektionen intramuskulär verabreicht. Die Blutveränderungen wurden bei Gaben von 0,5 mg/kg 24–144 h nach der Injektion mittels Blutausstrichpräparaten verfolgt. Die histologischen Veränderungen wurden von 24 bis 48 h nach der Injektion in Milz, Dünndarm und Knochenmark verfolgt.



Veränderungen der Lymphozytenzahl und der Zahl der polymorphkernigen Neutrophilen im peripheren Blute der Ätherratten und Kontrollratten nach Verabreichung von 0,5 mg N-Lost je kg Körpergewicht. Äthertiere (14) weiss, Kontrolltiere (10) schwarz. Lymphozyten punktiert. Ordinate: Prozentzahl der Elemente im Blutausstrich, Abszisse: Zeit nach Injektion in Stunden.

Die Versuchsergebnisse an Ratten, denen tödliche Gaben von N-Lost verabreicht wurden, zeigen, dass die Äthernarkose die Tiere nicht vor dem Tode schützt. Die Ätherratten starben durchschnittlich am 4. Tage nach der Gabe von 6 mg je kg Gewicht. Doch wird auch bei tödlichen Gaben von N-Lost der Verlauf der Blutveränderungen verlangsamt. 24 h nach der Injektion betrug der Mittelwert der Lymphozytenzahlen im peripheren Blute der Kontrollratten 6%. Bei den Ätherratten betrug der Mittelwert der Lymphozytenzahl noch 24%.

Die Verlangsamung der tödlichen Wirkung von N-Lost-Injektionen ist auch aus dem Verhalten der polymorphkernigen Leukozyten sichtbar. Der Anstieg dieser Zellen im peripheren Blute der Ätherratten war um 15% niedriger als jener bei den Kontrollratten. Die langsamere Schädigung des Organismus bei Äthernarkose bestätigt auch der Unterschied der Milzgrössen und Milzgewichte. Bei den Äthertieren war die Milz schwerer und grösser als bei den Kontrollen. Der Mittelwert des Milzgewichtes bei Äthertieren (8) betrug 193 mg, der Mittelwert des Milzgewichtes bei Kontrollratten (8) betrug 132 mg. In Prozenten war durchschnittlich das Milzgewicht der Äthertiere um 46% höher. Diese Differenz ist statistisch gut gesichert, da nach PÄTAU[12] $P = 0{,}00038$.

Bei Gaben von 0,5 mg N-Lost-Stoff war die Wirkung der Äthernarkose auf den Schädigungsgrad sehr gut erkennbar. Die Blutveränderungen bei den Äthertieren (14) waren, mit jenen der Kontrolltiere (10) verglichen, kleiner. Bei den Ätherratten erhält man in den ersten 48 h nach der Injektion einen Abfall der Lymphozyten im peripheren Blut um 18% und einen Anstieg der polymorphkernigen Leukozyten um 21%. Bei den Kontrollratten fallen die Lymphozyten in derselben Zeit um 49%, und die Leukozyten steigen um 80–90% an. Die Äthernarkose schwächt also die Wirkung von N-Lost-Injektion deutlich ab (Abb.).

Die Milderung der Reaktion der Ätherratten ist auch an den histologischen Bildern in der Milz, im Dünndarm und Knochenmark erkennbar. Bei den Ätherratten sind die Zellen weniger geschädigt. Die kleinere Schädigung ist sehr gut durch die Unterschiede der in Mitose gefundenen Zellen im Dünndarm der Ätherratten und Kontrollratten nachweisbar. Bei den Ätherratten findet man fast in jeder Lieberkühnschen Dünndarmkrypte sich teilende Zellen. Bei den Kontrollratten sind Mitosen ziemlich selten. Die Gesamtzahl der in 900 Lieberkühnschen Dünndarmkrypten gefundenen Mitosen beträgt bei den Ätherratten 2570. Die Mitosezahl bei den Kontrolltieren in 900 Dünndarmkrypten beträgt nur 760. Die Mitosezahl in 900 Dünndarmkrypten von unbehandelten Kontrollratten beträgt 2990. Die Äthernarkose schützt also den Dünndarm wesentlich gegen die Wirkung von N-Lost-Stoff-Injektion.

Die Ergebnisse der obenbeschriebenen Versuche zeigen, dass die Äthernarkose den Schädigungsgrad des tierischen Organismus nach N-Lost-Injektion, die intramuskulär gespritzt wurde, wesentlich erniedrigt. Es ist wahrscheinlich, dass bei der Reaktion des tierischen Organismus auf den verabreichten N-Lost-Stoff eine wesentliche Rolle dem Nervensystem zukommt.

J. CHURY

Biologisches Institut der Fakultät für Veterinärmedizin, Brno, ČSR, 15. September 1955.

Summary

The action of nitrogen mustard TS 160 (trichlortriethyl amine hydrochloride) upon the cellular structure of spleen, bone marrow, and Lieberkühns gland of the intestine is weaker in ether narcosis in rats. The same effect is noticed in the blood of the experimental rats. Narcosis cannot prevent the death of the experimental rats after lethal doses of this agent.

Quantitative Biological Determination of 5-Hydroxytryptamine

There are many biological assays for the estimation of 5-hydroxytryptamine (5-HT). Isolated, atropinized oestrous rat's uterus has been claimed by ERSPAMER[1] as a very sensitive and successful preparation. DALGLIESH, TOH and WORK[2] found the Erspamer's method tedious and recommended the use of atropinized colon of the rat.

We made a comparative study of these two most commonly used preparations with respect to their suitability for quantitative determination using a 2 + 2 procedure.

Male and female albino rats weighing more than 200 g were decapitated and bled according to the method of

[12] K. PÄTAU, Biol. Zbl. *63*, 161 (1943).

[1] V. ERSPAMER, Naturwissenschaften *40*, 318 (1953).

[2] C. E. DALGLIESH, C. C. TOH, and T. S. WORK, J. Physiol. *120*, 298 (1953).

Humphrey and Toh[3]. The isolated organ bath, which was similar to that of Boura, Mongar, and Schild[4], had a volume of 2·5 ml. All manipulations were made by hand. Water was circulated through the warming tubes by a Hoeppler's ultrathermostat. The rats' uteri were brought into oestrus by administering 100 μg of oestradiol during 3 or the same amount of stilboestrol during 2 preceding days. All uteri thus prepared showed the signs of oestrus hyperaemia and very often hydrops. The composition of the Ringer solution for both preparations was that recommended by Gaddum, Peart and Vogt[5] for the isolated rat's colon. For the uterus these authors recommended a similar solution but with 60 mg Ca instead of 30 mg. We obtained better results on uterus using 30 mg Ca. All Ringer solutions contained 22 μg/l of atropine sulphate. The intervals between contractions were 6–8 min for uterus and 5 min for colon. The latter was in contact with solution of 5-HT for 1·5 min. The uterine contractions which reached maximum in less than 30 s, were like those of the colon recorded with the frontal writing lever. The temperature of the bath fluid was 30°C in assays on uterus and 25°C on colon. Two doses of the standard and two of the unknown were used in each assay. The ratio of high to low dose was always 2:1 except in one assay where it was 1·5:1. Each assay consisted of 4 to 8 groups of contractions. In a few experiments the first 4 contractions were omitted when calculating the result. The limits of error and activity ratio were estimated by analysis of variance and the methods of calculation given by Schild[6]. The concentrations of 5-HT refer to the pure base.

To show which preparation is preferable for quantitative assay of 5-HT we applied 2 + 2 procedure both to rat's uterus and to colon. We assayed the concentration of 5-HT solution of known strength. 19 such assays on colon and 13 on uterus were made. The assays are unselected. The arithmetic means of the deviations from the true result are – 2·184% for colon and + 2·453% for uterus. The corresponding average limits of error (P = 0·05) are 8·8% and 10·5%. The harmonic mean of the index of precision $(\frac{s}{b})$ is 0·035 for colon and 0·047 for uterus.

The results show that rat's uterus is as reliable for a quantitative assay as the colon, the actual deviations from the true result being not significantly different. The use of the uterus is, however, more laborious because one in 3 uteri must be discarded owing to irregular responses, higher doses sometimes giving a smaller effect than lower, whereas almost every colon is suitable for the assay. We were, moreover, obliged to use higher concentrations for the uterus: the average concentration used for the uterus was 87 μg/ml, whereas for the colon it was 26 μg/ml. Owing to these advantages the colon is to be preferred for 2 + 2 assay of 5-HT.

Z. Supek and S. Milković

Department of Pharmacology, Medical Faculty, University of Zagreb, Yugoslavia, November 7, 1955.

Zusammenfassung

Die zwei meistgebrauchten Methoden der biologischen Auswertung von 5-Hydroxytryptamin, nämlich die am isolierten, atropinisierten Rattenuterus bzw. Rattencolon, wurden in bezug auf ihre Eignung für die quantitative Bestimmung verglichen. Für diesen Zweck bedienten wir uns der sogenannten 2 + 2-Dosen-Prozedur. Beide Methoden ergaben statistisch gleichwertige Resultate. Die Unregelmässigkeit der Uteruskontraktionen machen das Testieren öfters unmöglich, was beim Colon sehr selten der Fall ist. Ausserdem ist das Colon empfindlicher als der Uterus. Wegen dieser Vorteile ist das Colon für die quantitative biologische Auswertung von 5-Hydroxytryptamin dem Uterus vorzuziehen.

[3] J. H. Humphrey and C. C. Toh, J. Physiol. *124*, 300 (1954).

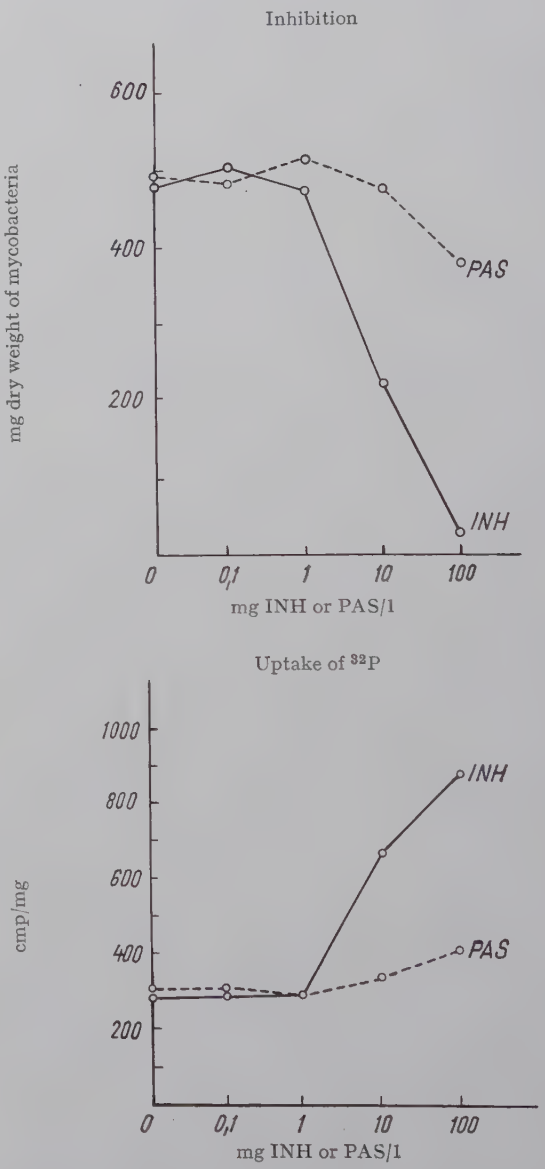
[4] A. Boura, J. L. Mongar, and H. O. Schild, Brit. J. Pharmacol. *9*, 24 (1954).

[5] J. H. Gaddum, W. S. Peart, and M. Vogt, J. Physiol. *108*, 467 (1949).

[6] H. O. Schild, J. Physiol. *101*, 115 (1942).

On the Mode of Action of Synthetic Antituberculotica

When studying the mode of action of synthetic tuberculostatica, i.e. INH and PAS, we came to the conclusion in our experiments that the use of concentra-



Saprofytic mycobacterium S incubated 7 days by 37°, grown on Long's medium (50 ml) with 0·25 μc ^{32}P/ml. cpm/mg = counts per minute per mg dry weight of mycobacteria.

tions of these drugs resulting in partial growth inhibition affected the uptake of phosphorus by the mycobacterial cell. We worked with a saprophytic strain "S" as the sensitive test-organism of our experiments, using the specific effect described earlier of these compounds on the genus mycobacterium[1]. Using the radioisotope ^{32}P as the indicator of phosphorus-quantity bound by the cells, we found an increased uptake of ^{32}P after the application of partial growth-inhibiting concentrations of INH and PAS, or else its accumulation in the mycobacterial cell. The following graphs show the relation between the growth-inhibition induced with INH or PAS and the uptake of ^{32}P in the mycobacterium "S".

From the graphs it is obvious that the increased ^{32}P uptake is strongly dependent on the rate of growth-inhibition. Because a similar increase of ^{32}P uptake or accumulation was also registered when using penicillin (300 i.u.) for 1 h on a strain of *Staphylococcus aureus* (a 24-h-old culture growth on broth in our experiments), a wellknown fact explainable by an enormous increase of nucleic acid as the result of penicillin action[2], we suppose that this fact, when induced with compounds of different structural composition, may be considered more generally than was the case until now. On the other hand, some Japanese authors observed that oxytetracycline exerts an inhibiting action on the incorporation of ^{32}P by *Staphylococcus aureus* strains[3].

There are some theoretical possibilities to explain the above-mentioned observed fact. One of them, based firstly on its unspecificity and secondly on some new investigations dealing with the problem of the high-energy phosphorus bounds[4] may be described as follows:

(1) The antituberculotica used do not destroy the synthesis of the high-energy phosphorus compounds (the oxidative phosphorylation);

(2) nevertheless the resolution of the energy of these compounds is decreased and thus accumulation of them occurs in the cells[5].

Further experiments are needed to show whether this hypothesis is right.

M. Polster

Institute of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Brno, Czechoslovakia, August 15, 1955.

Zusammenfassung

Beim Studium des Wirkungsmechanismus der synthetischen Tuberkulostatika INH und PAS wurde festgestellt, dass die inhibierenden Konzentrationen dieser Substanzen eine Steigerung des Verbrauches (evtl. Anhäufung) des Radiophosphors ^{32}P in Zellen der Mykobakterien verursachen. Diese Steigerung des ^{32}P-Verbrauches steht proportionell zur Inhibitionsstufe.

[1] A. Lembke, E. Krüger-Thiemer, R. B. Kuhn, and W. Uecker, Schweiz. Z. allg. Path. Bakt. *16*, 222 (1953).

[2] L. Ettlinger, Schweiz. med. Wschr. *85*, 271 (1955).

[3] Y. Miura, Y. Nakamura, Y. Yoshizawa, and H. Matsudaira, Antibiot. and Chemother. *3*, 822 (1953).

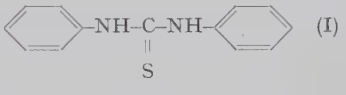
[4] H. A. Krebs. Brit. med. Bull. *9*, 97 (1953). – A. Kleinzeller, Chemické listy *49*, 376 (1955).

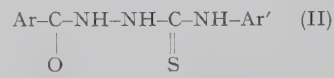
[5] M. Machebœuf, Bull. Soc. chim. France *30*, 161 (1948).

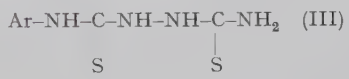
Activité *in vivo* de dérivés de la thiourée contre le virus de l'influenza[1]

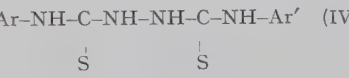
Les recherches sur les composés chimiques possédant une activité antivirale, en particulier en ce qui concerne le virus de l'influenza, ont surtout porté jusqu'à présent sur les antimétabolites, tels que les antagonistes d'acides aminés ou de bases puriques indispensables[2]. D'autre part, les tests généralement utilisés, et qui étaient basés sur l'inhibition du développement du virus en cultures de tissus ou sur embryon de poulet, ne donnaient que peu d'indications sur la portée pratique de cette inhibition, et un grand nombre de substances ainsi reconnues comme actives se sont révélées inefficaces contre l'infection chez l'animal[3].

Récemment, en recourant directement à un test chimiothérapeutique chez la souris, nous avons pu déceler une activité contre le virus de l'influenza chez plusieurs dérivés de la thiourée, en particulier chez le 4-chloro-4'-fluorothiocarbanilide[4]. Depuis, nous avons étendu cette étude à de nombreux composés analogues, afin de rechercher des relations entre constitution chimique et activité antivirale dans ce domaine. Les nouvelles substances ainsi examinées sont (à trois exceptions près) des molécules renfermant un ou deux groupements NH-CS-NH-. Ce sont principalement: 1° des dérivés substitués du thiocarbanilide (I); 2° des 1-acyl-4-arylthiosemicarbazides de formule générale (II); 3° des 1-(arylaminothioformyl)-thiosemicarbazides (III); 4° des 4-aryl-1-(arylaminothioformyl)-thiosemicarbazides (IV); et 5° des *bis*-anilides (V) de l'acide thiocarbohydrazide-*bis*-1, 5-thiocarbonique.


(I)


(II)


(III)


(IV)

(V)

Les composés (I), (II), (III), (IV) et (V) ont été préparés en faisant réagir des isothiocyanates d'aryles respectivement sur des arylamines[5], des hydrazides[6], la thio-

[1] Communication présentée au Congrès international de Chimie pure et appliquée de Zürich (Juillet 1955).

[2] *Cf.* I. Tamm, K. Folkers et F. L. Horsfall jr., Yale J. Biol. Med. *24*, 559 (1952); J. exper. Med. *98*, 219 (1953). – I. Tamm, K. Folkers, F. L. Horsfall jr. et C. H. Shunk, J. exper. Med. *99*, 227 (1954). – C. Hannoun, C. r. Acad. Sci. *236*, 864 (1953).

[3] *Cf.* K. K. Takemoto, M. L. Robbins et P. K. Smith, J. Immunol. *72*, 141 (1954).

[4] N. P. Buu-Hoï, P. Gley, N. D. Xuong et A. Bouffanais, C. r. Acad. Sci. *238*, 2582 (1954).

[5] *Cf.* N. P. Buu-Hoï, N. D. Xuong et N. H. Nam, J. chem. Soc. *1955*, 1573.

[6] N. P. Buu-Hoï, N. D. Xuong et N. H. Nam, C. r. Acad. Sci. *238*, 295 (1954).

Tableau I. Injection sous-cutanée

Thiocarbanilides	Dose totale par 20 g de poids d'animal mg	Survies au 13e jour	Dose léthale par kg de poids d'animal (toxicité aigüe) en g
4-Chloro-4′-fluoro-	10	6	0,75
2,5-Dichloro-	24	0	> 3,5
2,5,4′-Trichloro-	12	1	1,5
2,5-Dichloro-4′-fluoro-	8	4	1,25
2-Méthoxy-5-méthyl-	24	1	> 3,0
2,2′-Diméthoxy-5,5′-diméthyl-	24	2	> 3,0
4-Fluoro-2′-méthoxy-5′-méthyl-	12	2	1,5
4-Chloro-4′-fluoro-2-méthoxy-	12	1	1,5
4-Chloro-2′-méthoxy-5′-méthyl-	12	0	1,5
4-Bromo-2′-méthoxy-5′-méthyl-	24	0	> 1,5
Thiosemicarbazides			
4-Fluorophényl-	0,2	2	0,025
1-(Phénylaminothioformyl)-	0,4	0	0,05
1-(α-Naphtylaminothioformyl)-	0,2	2	0,025
1-(β-Naphtylaminothioformyl)-	3	1	0,3
1-(2-Xénylaminothioformyl)-	3	0	0,19
1-(*p*-Fluorophénylaminothioformyl)-	4	4	0,5
1-(*p*-Chlorophénylaminothioformyl)-	6	0	0,75
1-(*p*-Bromophénylaminothioformyl)-	20	1	3,0
1-(*p*-Isoamyloxyphénylaminothioformyl)-	28	0	> 3,0
4-Phényl-1-(phénylaminothioformyl)-	16	1	3,0
4-Phényl-1-(*p*-tolylaminothioformyl)-	20	0	1,5
4-*p*-Méthoxyphényl-1-(phénylaminothioformyl)-	24	0	3,0
4-*p*-Fluorophényl-1-(phénylaminothioformyl)-	20	1	3,0
4-*p*-Chlorophényl-1-(phénylaminothioformyl)-	30	4	> 3
4-*p*-Bromophényl-1-(phénylaminothioformyl)-	20	4	3,0
4-*p*-Ethoxyphényl-1-(phénylaminothioformyl)-	30	6	> 3
4-*p*-Isoamyloxyphényl-1-(phénylaminothioformyl)-	40	0	> 3
4-(2,4-Xylyl)-1-(phénylaminothioformyl)-	40	1	> 3
4-β-Naphtyl-1-(phénylaminothioformyl)-	40	0	> 3
4-α-Naphtyl-1-(phénylaminothioformyl)-	16	0	1,9
4-*p*-Fluorophényl-1-(*p*-fluorophénylaminothioformyl)-	24	3	> 3
4-*p*-Chlorophényl-1-(*p*-fluorophénylaminothioformyl)-	24	0	> 3
4-*p*-Bromophényl-1-(*p*-bromophénylaminothioformyl)-	24	2	> 3
4-*p*-Fluorophényl-1-(*p*-tolylaminothioformyl)-	24	1	> 3
4-*p*-Fluorophényl-1-(*m*-tolylaminothioformyl)-	24	0	> 3
4-*p*-Fluorophényl-1-(*p*-méthoxyphénylaminothioformyl)-	24	1	> 3
4-*p*-Fluorophényl-1-(*p*-éthoxyphénylaminothioformyl)-	24	2	> 3
4-*p*-Chlorophényl-1-isonicotinoyl-	8	0	1,25
4-*p*-Fluorophényl-1-isonicotinoyl-	8	1	1
4-*p*-Méthoxyphényl-1-isonicotinoyl-	6	0	0,75
4-*p*-Ethoxyphényl-1-isonicotinoyl-	16	5	1,5
4-*p*-Ethoxyphényl-1-salicoyl-	24	2	3
4-*p*-Ethoxyphényl-1-(5-chlorosalicoyl)-	24	1	3
4-*p*-Méthoxyphényl-1-(3,5-dichlorosalicoyl)-	20	4	3
4-*p*-Méthoxyphenyl-1-(5-bromosalicoyl)-	24	0	> 2,5
Composés divers			
Di-*p*-fluoroanilide de l'acide thiocarbohydrazido-*bis*-1,5-thiocarbonique	20	0	> 1,5
Di-*p*-chloroanilide de l'acide thiocarbohydrazido-*bis*-1,5-thiocarbonique	24	1	> 2,25
Di-*p*-phénétidide de l'acide thiocarbohydrazido-*bis*-1,5-thiocarbonique	24	1	> 2,25
4-Chloro-4′-fluorocarbanilide	24	1	> 1,5
Acide 2,4-dihydroxybenzoïque	20	4	> 3
Acide kojique	20	2	> 1,5

semicarbazide, des 4-arylthiosemicarbazides, et le thiocarbohydrazide[7].

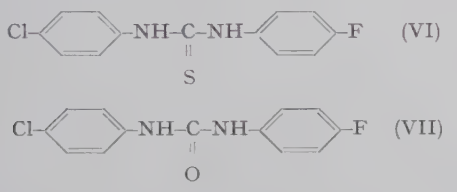
La technique expérimentale employée consiste à utiliser des souris de poids moyen de 20 g, auxquelles on administre par voie intranasale et sous anesthésie, une dose de virus de l'influenza de type A, souche PR 8 cultivée sur œufs embryonnés de poulet, suffisante pour produire 100% de mortalité chez les témoins avant le 13ème jour. La substance à examiner est administrée en 4 injections sous-cutanées: 1 le jour de l'infection, et les 3 autres 1 tous les 2 jours; quelques substances ont également été administrées par voie orale. Pour chaque substance, une série de 10 animaux traités et une série de 10 animaux témoins ont été utilisées, et pour plusieurs de ces substances, les séries ont été recommencées.

[7] N. P. Buu-Hoï, T. B. Loc et N. D. Xuong, Bull. Soc. chim. *22*, 694 (1955).

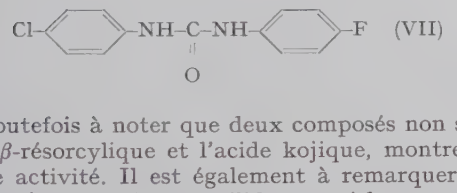
Tableau II. Administration orale

Thiocarbanilides	Dose journalière par 20 g de poids d'animal mg	Survies au 13e jour	Dose tolérée par kg et par jour g
4-Chloro-4′-fluoro-	7	2	0,375
4-Chloro-4′-fluoro-	7	1	0,375
2,5-Dichloro-4′-fluoro-	9	1	1,125
Thiosemicarbazides			
1-(*p*-Fluorophénylaminothioformyl)-	4,5	2	0,225
4-*p*-Chlorophényl-1-(phénylaminothioformyl)	20	0	1,0
4-*p*-Ethoxyphényl-1-(phénylaminothioformyl)-	22	1	1,125
4-*p*-Méthoxyphényl-1-(3,5-dichlorosalicoyl)-	15	0	0,75
4-*p*-Ethoxyphényl-1-isonicotinoyl-	6	0	0,30

Les résultats obtenus avec une cinquantaine de substances, et qui sont résumés dans les 2 Tableaux ci-dessus, confirment l'activité antivirale dans le groupe des dérivés de la thiourée, en particulier des composés fluorés et chlorés. Cette activité, notable lorsque le produit est administré par injection, est beaucoup moins importante par voie buccale. L'influence favorable du groupement $\rangle C=S$ est manifeste, comme il ressort de la chute d'activité observée lorsqu'on passe du 4-chloro-4′-fluorothiocarbanilide (VI) à son analogue oxygéné, le 4-chloro-4′-fluorocarbanilide (VII).



(VI)



(VII)

Il est toutefois à noter que deux composés non soufrés, l'acide β-résorcylique et l'acide kojique, montrent une certaine activité. Il est également à remarquer que le 4-chloro-4′-fluorothiocarbanilide possède une faible activité retardatrice sur l'évolution de la polyomyélite expérimentale chez la souris, produite par le virus Lansing (expérience pour laquelle nous remercions M. le Professeur Lépine de l'Institut Pasteur de Paris).

N. P. Buu-Hoï, A. Bouffanais,
P. Gley, N. D. Xuong et N. H. Nam

Département de Chimie organique de l'Institut du Radium, Université de Paris, et Laboratoires de Recherches de la Firme Roussel, I.S.H., Paris, le 1er novembre 1955.

Summary

A large number of sulphur-containing compounds bearing the thiourea group –NH–CS–NH–, including substituted thiocarbanilides, 1-acyl-4-arylthiosemicarbazides, 1-(arylaminothioformyl)-thiosemicarbazides, 4-aryl-1-(arylaminothioformyl)-thiosemicarbazides, and other related substances have been tested for potential antiviral activity. Several of these compounds have been found chemotherapeutically active against influenza virus.

Pitch Discrimination in the Minnow *(Phoxinus laevis)* at Different Temperature Levels

Training experiments have shown that the minnow is able to perceive tones within the range from about 20 to 5000 c/s by using its labyrinth (sacculus and lagena)[1]. Two tones of different frequency are distinguished[2]. The threshold of pitch discrimination at the level of 400 or 800 c/s is about a quarter of a tone (3% frequency difference). Above 1260 c/s, however, there is no pitch discrimination at all[3].

The two main theories explaining pitch discrimination are the place theory[4] and the telephone theory[5]. The place theory seems hardly applicable to the minnow, because any structure suited to serve as a pre-nervous frequency analyser (like the basilar membrane in higher vertebrates) is apparently lacking. The second theory, on the other hand, as modified by Wever in his volley theory[6], might be applicable[7]. As has been pointed out earlier, a rise in temperature will shorten the refractory period of nerve fibres and therefore increase certain sensory abilities in cold-blooded animals[8]. Similarly, if pitch discrimination in the minnow is really based on the volley principle, a rise in temperature of the animal would effect a rise in its upper limit of pitch discrimination. The following experiments were undertaken in order to test this point[9].

Training method.—According to the method of Dijkgraaf and Verheijen (1950), whose experiments were made at $\pm$ 20°C, blinded minnows were trained to react to a frequency difference of a major third (about 24%) in the range of 400–500 c/s, at room temperature (16°C). By using increasing frequencies, the limit of pitch discrimination was determined. After that the temperature was raised to 25°C and again the limit of pitch discrimination was determined.

[1] K. v. Frisch und H. Stetter, Z. vgl. Physiol. *17*, 686 (1932).
[2] Th. A. Wohlfahrt, Z. vgl. Physiol. *26*, 570 (1939).
[3] S. Dijkgraaf and F. J. Verheijen, Z. vgl. Physiol. *32*, 248 (1950).
[4] H. L. F. v. Helmholtz, 1857 [quoted by E. G. Wever: *The theory of hearing* (John Wiley and Sons, Inc. New York; Chapman and Hall, Ltd., London, 1949), p. 25].
[5] W. Rutherford, 1886 [quoted by E. G. Wever (1949), p. 77].
[6] E. G. Wever, 1949.
[7] O. Löwenstein and T. D. M. Roberts, J. Physiol. *114*, 471 (1951).
[8] E. D. Adrian, K. J. W. Craig, and R. S. Sturdy, Proc. roy. Soc. [B] *125*, 435 (1938).
[9] Preliminary results were obtained by W. van der Lee in this laboratory (unpublished records).

Every experiment was started by repeatedly offering the fish an interrupted tone of a given frequency. The fish, being never rewarded, soon gave up reacting to this "neutral-tone signal". After at least a quarter of an hour, every second tone of the neutral-tone signal was suddenly replaced by a tone of another frequency without interrupting or altering the rhythm of the signal. The reaction of the animal was observed (observation P), the fish rewarded by food and, still without altering the rhythm, the "training signal" brought back to the neutraltone signal. Sequence of tones:

After waiting till the animal was quiet again, the next observation could be started.

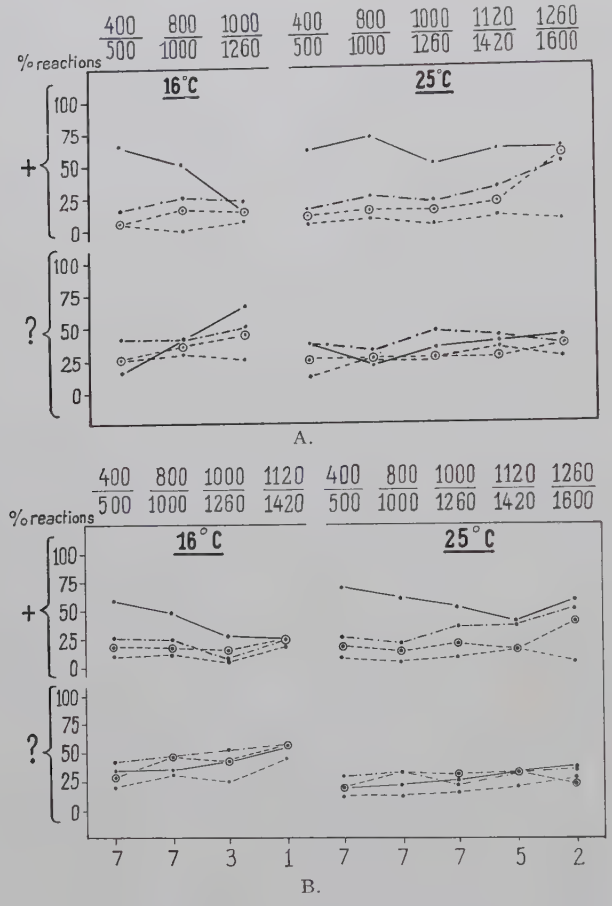


Fig. 1. Reactions of trained minnows to pitch at different temperatures.—*A* Results of one single fish. *B* Mean of results of all seven fishes tested.—*Ordinate:* Percentage of positive (+) and doubtful (?) reactions (100% = 20 observations). *Abscissa:* Training stimulus (frequency difference in c/s: major third).

·———·-·———· Frequency reactions (P).
·-·-·-·-·-·-·-· Intensity reactions (C_i).
○---○---○---○ Neutral-tone reactions (C_n).
·- -·-·-·-·-·- Spontaneous "reactions" (C_a).

The following control observations were made:

(1) C_i: Tests with intensity difference (loudness of neutral-tone signal alternating low and high), because intensity differences between the two tones of the interval might be of importance[10].

(2) C_n: Reactions on neutral-tone signal were observed.

(3) C_a: Spontaneous "reactions" in the absence of sound were observed.

Apparatus.—The same apparatus as described by Dijkgraaf[11] was used with slight alterations.

Method of observation.—About 50% of the observations were made by the author with one assistant. The latter handled the apparatus and gave instructions whenever an observation period began. In addition he put down the records of the observer and, afterwards, gave the signal when to feed. In this way the observer did not know, while observing, if a reaction could be expected. These observations and those made by the author, both handling the apparatus and observing at the same time, agreed satisfactorily. At all frequencies examined for every fish fit for use twenty observations were made for each P, C_i, C_n and C_a. The reactions were recorded as follows: + = the typical feeding reaction; ? = agitation, but no typical feeding reaction; – = no reaction at all. The reactions of the animals during the three control observations were recorded in the same way. Consequently, the more + reactions in answer to a frequency difference as compared with the + reactions in answer to the controls C_i, C_n and C_a, the better the frequency discrimination.

Results.—The results of one single fish and the mean of the results of all seven fishes are shown in Figures 1*A* and *B* respectively. In both graphs the experimental results at 16°C will be found on the left hand side, and those at 25°C on the right hand side. In Figure 1*B* the figures at the bottom of the diagram serve to show the number of animals fit for use (and used) for each interval. Because of the individually different performances this number decreased with rising pitch.

The following conclusions seem justified:

(I) The upper limit of pitch discrimination in minnows is raised from 800–1260 c/s at 16°C to 1260–1420 c/s at 25°C. Whereas all 7 fishes tested reacted to a frequency difference of 1000–1260 c/s at 25°C only 3 of them did (less well) at 16°C.

(II) This change is not due to a general activation of these coldblooded animals by the higher temperature: (i) the graphs of the P+ reactions are either tilted or at a higher level at 25°C compared with those at 16°C; (ii) the graphs of C_i, C_n and C_a are at the same or at a lower level at 25°C as compared with those at 16°C respectively (in Figure 1*B* only figures from equal numbers of fish should be compared). A general activation would show a rising of all graphs at 25°C.

The outcome of these experiments supports the view that pitch discrimination in fish might be based on the volley principle.

W. H. Dudok van Heel

Laboratory of Comparative Physiology, Utrecht, Holland, October 10, 1955.

Zusammenfassung

Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass die Elritze (*Phoxinus laevis*) imstande ist, Töne nach ihrer Frequenz (Tonhöhe) zu unterscheiden, jedoch nur im Frequenzgebiet bis zu etwa 1260 Hz, nicht darüber (die obere Hörgrenze liegt bei etwa 5000 Hz). Es wurde geprüft, welchen Einfluss Wechsel der Temperatur auf die Lage dieser oberen Schwelle der Frequenzunterscheidung hat. Sie lag für die einzelnen Versuchstiere bei

[10] S. Dijkgraaf and F. J. Verheijen, Z. vgl. Physiol. *32*, 248 (1950). – D. Poggendorf, Z. vgl. Physiol. *34*, 222 (1952).

[11] S. Dijkgraaf, Z. vgl. Physiol. *34*, 104 (1952).

16°C zwischen 800 und 1260 Hz; bei 25°C zwischen 1260 und 1420 Hz, also höher. Der Unterschied beruht nicht auf grösserer Lebhaftigkeit oder Reaktionsbereitschaft der Fische bei der höheren Temperatur. Das Ergebnis steht im Einklang mit der Vermutung, dass die Tonfrequenzunterscheidung bei Fischen nach dem «volley principle» (WEVER) erfolgt.

PRO EXPERIMENTIS

Papierchromatographische Ultramikro-Alkalimetrie

Die von WIELAND und Mitarbeitern[1] ausgearbeitete und zur quantitativen Bestimmung kleinster Mengen (etwa 1,5 γ) von Aminosäuren benützte retentiographische Methode lässt sich, wie wir fanden, auf die Identifizierung und Bestimmung anorganischer Ionen übertragen. Am Beispiel der Ultramikrobestimmung anorganischer Basen sei die Arbeitsweise beschrieben, mit deren Hilfe es gelingt, noch etwa 2 γ OH-Ionen (das sind ca. 5 γ NaOH) zu erfassen, eine Menge, die auf trimetrischem Weg mit Farbindikatoren nicht mehr bestimmbar ist[2].

Die auf OH′ zu prüfende Lösung wird in einer Reihe mit Kontrollösungen, die bekannte Mengen der Base enthalten, auf der Startlinie aufgetragen. Die Entwicklung des Retentions-Chromatogramms erfolgt mit einem HCl-haltigen Lösungsmittel; 96%iger, mit 1% Benzol denaturierter Alkohol erwies sich als geeigneter als Dioxan oder Tetrahydrofuran. Die verwendete HCl-Konzentration – wir arbeiteten mit HCl-Konzentrationen von 0,1 bis 0,01%, das sind 1,3 bis 0,13 cm³ 2n HCl auf 100 cm³ – soll entsprechend der zu messenden OH′-Menge, die in einem orientierenden Vorversuch festgestellt werden kann, gewählt werden, die Laufzeit möglichst kurz (vgl. Tabellen I und II). Wie Versuche zeigten, ist Temperaturkonstanz erforderlich.

[1] TH. WIELAND und E. FISCHER, Naturwissenschaften *35*, 29 (1948). – TH. WIELAND, Angew. Chem. *60*, 313 (1948). – TH. WIELAND und L. WIRTH, Angew. Chem. *63*, 171 (1951). – TH. WIELAND und U. FELD, Angew. Chem. *63*, 258 (1951). – Vgl. auch B. ERDEM, B. PRIJS und H. ERLENMEYER, Helv. chim. Acta *38*, 267 (1955).

[2] Vgl. P. L. KIRK, *Quantitative Ultramicroanalysis* (J. Wiley & Sons/Chapman & Hall, New York-London 1951).

Tabelle I
NaOH
Lösungsmittel: 98 cm³ 96%iger Alkohol + 2 cm³ Wasser

Chromatogramm Nr.	1	2	3	4	5	6	7
HCl-Konzentration %	0,05	0,05	0,05	0,025	0,025	0,01	0,01
Temperatur °C	25	30	30	25	30	25	30
Laufzeit h	1	½	1	1½	1	2½	1
Gefunden cm² je. *a* 5 γ				0,68	0,46	0,45	0,71
b 10 γ	1,05	0,69	0,64	1,32		0,93	1,34
c 15 γ	1,48	1,24	1,09		1,52	1,43	
d 20 γ	2,07	1,60	1,34	2,77	1,94		
cm²/ε *a*				5,44	3,68	3,60	5,68
b	4,20	2,76	2,56	5,28		3,72	5,36
c	3,92	3,28	2,88		4,08	3,84	
d	4,14	3,20	2,68	5,54	3,88		

Tabelle II
Na_2CO_3
Lösungsmittel: 98 cm³ 96%iger Alkohol + 2 cm³ Wasser

Chromatogramm Nr.	8	9	10	11	12	13	14
HCl-Konzentration %	0,05	0,025	0,025	0,025	0,025	0,01	0,01
Temperatur °C	25	25	30	30	30	25	30
Laufzeit h	1	1½	½	1	1	2½	1½
Gefunden cm² je. *a* 5 γ		0,54					
b 10 γ	0,62	1,10		0,54		1,07	1,50
c 15 γ	1,00	1,64				1,59	2,25
d 20 γ	1,37		1,13	1,14	1,40	2,08	
e 30 γ			1,74	1,65	2,06		
cm²/ε *a*		5,83					
b	3,29	5,83		2,86		5,67	7,95
c	3,53	5,80				5,62	7,95
d	3,63		3,00	3,00	3,71	5,51	
e			3,07	2,92	3,64		

Sprüht man das erhaltene Chromatogramm mit Kongorotlösung, so sind die an den Auftragungsstellen in der Salzsäurefront entstandenen Lücken deutlich erkennbar. Es ist auch möglich, durch Betrachten des entwickelten, nicht besprühten Chromatogramms im UV.-Licht sowohl Salzsäure- als Lösungsmittelfront als hellleuchtende Linien zu erkennen, die direkt nachgezeichnet werden können[3].

Die durch Sprühen mit Kongorot oder Zeichnen im UV.-Licht sichtbar gemachten Lücken werden mit einem Planimeter[4] gemessen[5]. Die in einem Chromatogramm erhaltenen Werte sind den aufgetragenen Basenmengen direkt proportional. Bei sorgfältigem Arbeiten liegt die Fehlergrenze bei $\pm$ 5%. Es lassen sich so zum Beispiel NaOH, Na_2CO_3, $NaHCO_3$ bestimmen. Die Salzsäure lässt sich durch andere Mineralsäuren ersetzen.

In den Tabellen I und II sind einige Kontrollversuche zusammengestellt, die die Brauchbarkeit der Methode belegen. Die Tabellen enthalten unter cm^2/ε die aus den gemessenen Lückengrössen berechnete Fläche, die einem γ-Äquivalent ($= \varepsilon$) entspricht.

Über die Bestimmung kleinster Mengen anderer anorganischer Ionen nach dieser Methode wird später berichtet.

B. Prijs und H. Erlenmeyer

Anstalt für Anorganische Chemie der Universität Basel, den 13. November 1955.

Summary

A new method, based on retention-paperchromatography, is developed for ultramicrodetermination of inorganic bases.

[3] Bei allen Versuchen wurde Whatman-Nr.-1-Papier verwendet.

[4] Firma J. Amsler, Schaffhausen.

[5] Die absolute Grösse der erhaltenen Lücken hängt einmal von der OH'-Menge, dann aber auch von der HCl-Konzentration und daneben von Temperatur, Laufzeit und Feuchtigkeit ab, so dass nur gleichzeitig unter gleichen Bedingungen laufende Chromatogramme direkt verglichen werden können.

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

STUDIORUM PROGRESSUS

The Chemical Nature of the Antibacterial Substance Present in *Aucuba japonica* Thunbg.

By J. E. Rombouts and J. Links[1]

I.—*Introduction*

Several compounds with antibiotic properties have been demonstrated to occur in green plants. The majority of them has been exclusively tested for growth-inhibiting activity against certain strains of common bacteria in order to detect antibacterial substances which might be effective against zoopathogens. In this respect an impressive amount of work has been done, among others. by Osborn[2], Carlson *et al.*[3], and Collier and van der Pijl[4].

Although the occurrence of substances with antibacterial properties in Phanerogams was found to be a common feature, identification of these substances has been carried through in only a small number of cases. This report deals with the identification and biological characterization of the antibacterial compound first demonstrated to be present in leaves of *Aucuba japonica* by Osborn[2], who found aqueous extracts of the variety with maculated leaves (var. *variegata* D'Ombr.) to be effective *in vitro* against *Staphylococcus aureus*, but not against *Escherichia coli*; similar extracts of the variety with entirely green leaves (var. *viridis* Hort.) were said to be ineffective to either one of these bacteria.

Winter and Willeke[5] stated that juices expressed from leaves and roots of *A. japonica* strongly inhibited the growth of a population of the most different kinds of soil bacteria, and that *Bacillus subtilis* and both *S. aureus* and *E. coli* were very sensitive species. More recently Fitzpatrick[6] found that aqueous extracts of the leaves of *A. japonica* were effective *in vitro* against a human strain of *Mycobacterium tuberculosis*, activity being greater in autumn than in spring. These investigators do not reveal whether they used a special variety of *Aucuba*.

II.—*Experimental*

(1)—*Detection of an inactive precursor.* In the ordinary routine screening for the presence of antibiotic activity in crude plant juices, it was found that squeezed leaves of *A. japonica* var. *variegata* showed a marked activity against both the spores of *Bacillus subtilis* and the conidia of *Penicillium italicum*. When the fresh *Aucuba* leaves were immersed in boiling water for a few minutes before squeezing, the activity of leaf extracts against both micro-organisms was entirely destroyed; it could be restored, however, by mixing the inactive leaf juice with a minute amount of crushed fresh *Aucuba* leaves, an amount which was so small that it exerted no noticeable inhibition by itself. This observation led us to the assumption that in *Aucuba* leaves an antimicrobial substance is present in the form of an inactive, thermostable compound which, on mixing with an enzyme, is decomposed and gives rise to components, at least one of which is capable of inhibiting the growth of certain microorganisms. So far it was still uncertain whether one single component accounted for both the antibacterial and the antifungal activity.

(2)—*Isolation from leaves of an activating enzyme preparation.* An active crude enzyme mixture was prepared as follows: From fresh leaves of *A. japonica* var. *variegata* the petioles were removed. The laminae were frozen

[1] N. V. Philips-Roxane, Agro-Biological Laboratory "Boeksteyn", 's-Graveland, and Central Laboratory, Weesp, The Netherlands.

[2] E. M. Osborn, Brit. J. exper. Pathol. *24*, 227 (1943).

[3] H. J. Carlson, H. D. Brissell, and M. G. Mueller, J. Bact. *52*, 155 (1946). – H. J. Carlson and H. Douglas, J. Bact. *55*, 235 (1948). – H. J. Carlson, H. G. Douglas, and J. Robertson, J. Bact. *55*, 241 (1948).

[4] W. A. Collier and L. van der Pijl, Chron. Naturae *106*, 73 (1950).

[5] A. G. Winter and L. Willeke, Naturwissenschaften *38*, 262 (1951).

[6] F. K. Fitzpatrick, Antibiot. Chemother. *4*, 528 (1954).

with the aid of solid CO_2 and collected in a towel in which they were pounded to pieces of about 1 cm^2. These small pieces were ground in an ordinary household mincing machine, previously cooled with solid CO_2. The resulting product was hereupon extracted for 5 min at – 50°C in a Turmix with 8 times its weight of acetone. This extraction was repeated once with a fresh portion of acetone and finally completed with a same volume of ether, all at – 50°. If portions of the remaining light green powder were stirred for 20 min with about 30 times its amount of 0·01 N phosphate buffer, pH 7, and hereupon filtered, almost clear solutions were obtained which possessed an excellent enzyme activity. This justifies the conclusion that easily dissociating prosthetic groups were apparently absent and not needed for the enzyme's action, a property which pointed to a hydrolytic enzyme.

(3)—*Isolation and identification of the inactive precursor.* Work was now directed towards the isolation of the precursor of the antibacterial substance. We had noticed that its thermostability was increasingly affected by lowering the pH. This observation and the apparent hydrolytic nature of the activating enzyme made an easily hydrolyzable glycosidal structure very likely. Therefore the classical method of BOURQUELOT and HÉRISSEY[7] for the isolation of glycosides was applied at once.

These French investigators first used this method for the isolation of the main glucoside aucubin, then new, from the ripe seeds of *Aucuba japonica*. The glycoside we isolated from unripe seeds as the inactive precursor of the antibacterial substance turned out to be identical with aucubin.

Green fruits (berries) of *A. japonica* var. *variegata* were longitudinally cut. In this way the single central seed was cut as well. The green pericarp was peeled off by hand, whereupon the seed halves were immediately put into boiling 90% ethanol and left boiling on a reflux for 35 min in order to inactivate the enzymes. Subsequently the seed halves were removed from the alcohol and ground in a Peppink hammer mill.

The resulting seed powder was again extracted for 15 min with boiling 90% ethanol on a reflux. The first and second extracts were pooled and the volume drastically reduced *in vacuo*. After addition of an adequate amount of water and some $CaCO_3$, a little baker's yeast was added and the extract fermented at 25°C to remove free sugars. CO_2 production ceased after 4 days. The yeast was then killed by boiling, and the mixture centrifuged, decolourized with an active charcoal (Norit) and filtered. From the resulting clear, pale yellow sirupy liquid, almost white needles crystallized during slow evaporation in a desiccator over concentrated sulphuric acid. The crystals were collected on a filter and washed with 95% ethanol and ether. 390 g of fresh green fruits yielded 3·5 g of white crystals, m.p. 180°C (uncorrected). Repeated crystallization from 80% ethanol did not alter the melting point. With the aid of the *Aucuba* enzyme mixture it was easy to demonstrate that the crystalline compound was the inactive precursor.

The identity of our product with aucubin was established by:

(a) its solubility in different solvents: water, methanol, ethanol, ether, and chloroform;
(b) the formation of a brownish-black precipitate on mixing an aqueous solution with diluted mineral acids and gentle heating; prolonged heating of such acid solutions made them give off a penetrating, pleasant and characteristic odour (cp. BOURQUELOT and HÉRISSEY);
(c) the characteristic blue solution caused by reagent A (10 vol. of glacial acetic acid, 1 vol. of 0·2% aq. solution of $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ and 0·5 vol. of conc. HCl) of HILL and VAN HEYNINGEN[8];
(d) a sugar analysis: calculated (as glucose) 52·4%, experimental 49·4%;
(e) its melting point: 180°C (uncorrected); BOURQUELOT and HÉRISSEY[9] 181°; KARRER and SCHMID[10] 182°–183°; TRIM and HILL[11] 180°–182°;
(f) its specific rotation in water: $[\alpha]_D^{21} = -163{\cdot}1$ (c = 1·6); BOURQUELOT and HÉRISSEY[9] $[\alpha]_D = -173{\cdot}1$ (c = 2·956); LEBAS[12] $[\alpha]_D = -164{\cdot}4$ (c = 2·007); BERGMANN and MICHALIS[13] $[\alpha]_D^{21} = -171{\cdot}4$ (c = ?); KARRER and SCHMID[10] $[\alpha]_D^{15} = -162{\cdot}0$ (c = 1·988) and $-162{\cdot}3$ (c = 1·128); TRIM and HILL[11] $[\alpha]_D^{18} = -164{\cdot}7$ (c = 1·5);
(g) its UV. absorption spectrum: we also found the unpronounced absorption maximum at about 270 mμ and the rapidly increasing absorption from about 250 mμ towards shorter wave lengths (cp. KARRER and SCHMID[10], and TRIM and HILL[11]).

(4)—*Chromatographic isolation of aucubin from the Aucuba plant.* Glycosides are adsorbed from aqueous plant extracts by charcoal. Many other adsorbed substances can be removed from the charcoal by washing with water, whereas the glycosides can be eluted afterward with diluted ethanol. TRIM and HILL[11] used this principle for the isolation of aucubin. They stirred the plant extracts with charcoal, filtered, washed with water, refiltered, washed with ethanol, and filtered again. We used a simple chromatographic method for the same fractionation.

The aqueous extract from the natural raw material (e.g. leaves) was poured onto a column of Norit (chromatographic quality P.K. 0·1–0·25). The column was hereupon washed with water until the reaction for chlorine in the eluate had become negative. Washing was then continued with another 30% of the volume of water used for removing the chlorine. At that time no aucubin had been removed as yet from the column; this was regularly checked by a simple colour reaction in samples of the eluate. Subsequently the column was eluted with 50% ethanol, which removed at once the major part of the adsorbed aucubin. After some time the amount of eluted aucubin decreases sharply, whereupon only minute amounts are further released by the ethanol. Evaporation *in vacuo* of the collected ethanol eluate yields a pale brown syrup from which white crystals of aucubin can easily be obtained by crystallization from water and one recrystallization from 80% ethanol.

(5)—*Antibiotic activity of aucubin.* Once we had crystalline preparations of aucubin to hand, it was easy to prove that the products of hydrolysis were responsible for the activity both against *P. italicum* and *B. subtilis*. We extended these observations with several other micro-organisms and found an activity spectrum which is presented in the Table. The activity was graded accord-

[7] E. BOURQUELOT and H. HÉRISSEY, C. r. Soc. biol. *104*, 695 (1902); C. r. Acad. Sci. Paris *134*, 1441 (1902).

[8] R. HILL and R. VAN HEYNINGEN, Biochem. J. *49*, 332 (1951).

[9] E. BOURQUELOT and H. HÉRISSEY, Ann. Chim. *4*, 289 (1905).

[10] P. KARRER and H. SCHMID, Helv. chim. Acta *29*, 525 (1946).

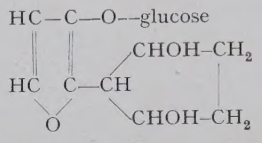
[11] A. R. TRIM and R. HILL, Biochem. J. *50*, 310 (1952).

[12] M. C. LEBAS, J. Pharm. Chim. [6] *30*, 390 (1909).

[13] M. BERGMANN and G. MICHALIS, Ber. deutsch. chem. Ges. *60*, 935 (1927).

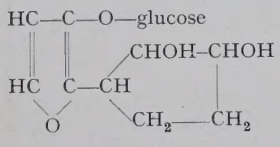
ing to the diameter of the zones of growth inhibition formed on nutrient agar around holes containing enzyme-activated aucubin solutions in three concentrations. The activity spectrum of crystalline aucubin exactly matches that which can be obtained with crude juices from *Aucuba* leaves, irrespective of whether these originate from the variety *variegata* or *viridis*. This indicates that the activity results from the formation of aucubigenin which is both antibacterial and, to a less extent, fungicidal. The fungicidal action is rather specific for only a small number of fungi, *Penicillium italicum* being by far the most sensitive species met with.

Discussion. Aucubin (synonyms: rhinanthin, aucuboside) was first found in the green parts of *Rhinanthus Crista-gallii* L. by LUDWIG[14] in 1868. It was first described from *Aucuba japonica* by BOURQUELOT and HÉRISSEY[7]. Its chemical nature was later investigated in detail by BERGMANN and MICHALIS[13], KARRER and SCHMID[10], NAKAMURA[15], and TRIM and HILL[11]. It was not until 1946 that KARRER and SCHMID[10] were capable of suggesting the structure formula (I) which explained all the established properties.

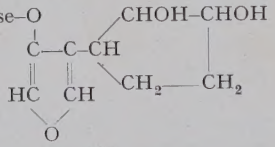


(I)

In 1950 NAKAMURA[15] gathered evidence for one of the two formula's [II] and [III].



(II)



(III)

Under the influence of β-glycosidases (e.g. emulsin) or an acid hydrolysis, the aglucone, aucubigenin, which has the substituted furan structure, is set free. Because of its β-hydroxy group this aglucone is extremely unstable and therefore it has never been isolated (KARRER and SCHMID[10]). Especially in acid solutions, it easily forms a derivate of succindialdehyde which in turn polymerizes readily, building poorly soluble dark coloured products. For this reason it was impossible for us to decide whether the aglucone itself possesses the antibiotic properties or whether this is due to the formation of a di- or polymere.

Aucubin has been demonstrated in many plant species belonging to taxonomically very different families. A recent review of the plants families in which this glycoside was found to be present is given by TRIM and HILL[11]. Because of its widespread occurrence, we were not surprised to find that, in contrast with the results obtained by OSBORN[2], both *Aucuba* varieties: *viridis* and *variegata*, yielded extracts with similar antibiotic properties which in both cases could be proved to be due to the aucubin content. Perhaps seasonal differences in the constituents of the leaves, as reported by FITZPATRICK[6], may be responsible for these contradictory results.

We found aucubin to be distributed throughout the whole *Aucuba* plant, including its roots. Though HATTORI[16] emphasized its absence in the ripe pericarp, we found it in that tissue of green fruits in quite appreciable amounts.

Antibiotic activity of crystalline aucubin after activation with a hydrolytic enzyme from *Aucuba* leaves

Micro-organism	Concentration of aucubin: 0·1%	1%	3%
Micrococcus aureus	±	+	++
Escherichia coli	±	+	+
Bacillus subtilis	+	++	+++
Mycobacterium phlei	+	++	+++
Pythium debaryanum	–	–	–
Phytophthora cactorum	–	–	±
Phytophthora cinnamomi	–	–	–
Rhizopus nigricans	–	–	–
Sclerotinia fructigena	–	–	±
Chaetomium globosum	–	–	–
Ophiostoma coerulescens	–	–	±
Ophiostoma paradoxum	–	±	+
Glomerella cingulata	–	–	–
Diaporthe alnea	–	–	±
Gibberella pulicaris	–	–	–
Pleospora lycopersici	–	–	–
Mycosphaerella pinodes	–	–	–
Torulopsis utilis	–	–	–
Candida krusei	–	–	–
Ustilago nuda	–	±	+
Phialophora heteroderae	–	–	–
Phoma betae	–	–	±
Septoria lycopersici	–	–	±
Colletotrichum lindemuthianum	–	–	±
Penicillium italicum	±	++	+++
Penicillium martensii	–	–	–
Aspergillus flavipes	–	–	–
Aspergillus niger	–	–	–
Trichoderma viride	–	–	±
Botrytis allii	–	–	–
Botrytis cinerea	–	–	–
Verticillium dahliae	–	–	–
Alternaria porri	–	–	–
Alternaria tenuis	–	–	–
Cercospora beticola	–	–	±
Fusarium culmorum	–	–	±

Acknowledgement. We are indebted to Mrs. H. H. HELLEKAMP for much technical assistance, and to Mr. VAN PELT and Mr. KEUKER for help in determining the physical constants.

Résumé

1° La substance antibactérielle des feuilles d'*Aucuba japonica* est identifiée comme étant l'aucubigénine. Ce furane substitué se forme à partir de la β-glucoside aucubine sous l'action d'un enzyme hydrolytique.

2° En dehors d'une action générale antibactérielle, l'aucubigénine a des propriétés antifongiques bien spécifiques.

3° L'aucubigénine se forme également dans les extraits crus des feuilles des deux variétés: *variegata* et *viridis*.

4° L'aucubine se trouve distribuée dans la plante entière, y compris le péricarpe des fruits verts.

5° A l'aide d'une colonne de charbon activé, l'aucubine est facilement isolée des feuilles d'*Aucuba* dans un état très pur par une méthode chromatographique.

[14] H. LUDWIG, Arch. Pharm. *186*, 64 (1868).

[15] Y. NAKAMURA, J. chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sect. *71*, 123 (1950); *71*, 186 (1950).

[16] S. HATTORI, Miscell. Rep. Res. Inst. Natural Resources *17/18*, 163 (1950). Cited in: S. FUJISE, N. KUBOTA, and S. HISHIDA, J. chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sect. *73*, 777 (1952).

Die Forschungslaboratorien der Sandoz A.G. haben einen entscheidenden Anteil an der Reindarstellung und Konstitutionsaufklärung der herzwirksamen Glykoside und leisteten wesentliche Beiträge zu deren pharmakologischen Erforschung.

Aus diesen grundlegenden Arbeiten resultierten für die Therapie der Herzkrankheiten folgende Spezialpräparate:

Acylanid
Cedilanid
Digilanid
Scillaren
Strophosid

SANDOZ

SANDOZ A.G.

NEUERSCHEINUNG

Internationale Kommission zum Schutze des Rheins gegen Verunreinigung

Bericht der Expertenkommission über die physikalisch-chemische Untersuchung des Rheinwassers

1. Serie Juni 1953 bis Juni 1954

Ausgearbeitet vom Sekretariat der Kommission unter der Leitung von Herrn Dr. F. Zehender, Zürich, und von der Kommission der Delegierten genehmigt in der Sitzung vom 14.–17. September 1955 in Strassburg

Commission Internationale pour la Protection du Rhin contre la Pollution

Rapport de la Commission des experts sur les analyses physico-chimiques de l'eau du Rhin

1ère série juin 1953 à juin 1954

Redigé par le secrétariat de la Commission sous la direction de M. le Dr. F. Zehender, Zurich, et accepté par la Commission des délégués lors de la réunion du 14 au 17 septembre 1955 à Strasbourg

(1956) 53 pp., 22 Fig., 17 Tabellen / tableaux · Broschiert / broché Fr. 8.30 (DM 8.30)

INHALTSVERZEICHNIS · TABLE DES MATIÈRES

Vorwort – Mitglieder der Experten-Kommission – Untersuchungslaboratorien – Tagungen der Expertenkommission – Einleitung – Untersuchungsprogramm – Die Methoden der Wasseranalysen – Darstellung und Auswertung der Untersuchungsergebnisse – Vergleich der Werte in den Querprofilen sowie der vormittags und nachmittags erhobenen Proben – Der physikalisch-chemische Zustand des Rheins im Längsprofil – Besprechung der Ergebnisse – Die an den holländischen Stationen erhaltenen Untersuchungsergebnisse – Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Préface – Membres de la Commission des experts – Laboratoires participant aux recherches – Séances de la Commission des experts – Introduction – Programme de recherches – Les méthodes analytiques – Représentation et élaboration des résultats – Comparaison des valeurs des profils transversaux et des échantillons prélevés matin et après-midi – L'état physico-chimique du Rhin dans son profil longitudinal – Interprétation des résultats – Les résultats obtenus aux stations hollandaises – Résumé et conclusions

BIRKHÄUSER VERLAG · BASEL / STUTTGART